

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÔLE DES ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE
DANS L'INDUCTION DE MÉCANISMES D'ADAPTATION
AU CADMIUM DANS LES CELLULES CACO-2

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
GUILLAUME B CARDIN

AOÛT 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier et à saluer toutes les personnes qui m'ont aidé et soutenu dans la recherche décrite dans ce mémoire, ainsi que dans sa rédaction.

Un énorme merci à Catherine Jumarie, ma directrice, pour son accueil, ses conseils éclairés, sa gentillesse et surtout pour son temps et son soutien.

Merci également à toutes ces personnes sympathiques que j'ai côtoyées durant mes deux années au laboratoire : Marc Mantha, Pascale Carrière, Loubna El Idrissi, Corine Martineau, Dominique Labelle et tous les autres, pour leur aide, et pour toutes ces conversations, autant sur la biologie que sur la vie en général.

Merci aux membres de mon comité d'orientation et de révision de mémoire : Diana Averill, Robert Moreau et Monique Boily, pour leur temps et leurs suggestions.

Et merci à Mélissa Meunier, ma famille et mes amis, de m'avoir soutenu et écouté.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
LISTE DES SYMBOLES	ix
RÉSUMÉ	x
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
LE CADMIUM COMME POLLUANT ENVIRONNEMENTAL	3
1.1 Généralités	3
1.2 La toxicité du cadmium	4
CHAPITRE II	
LE STRESS OXYDATIF	6
2.1 Les espèces réactives de l'oxygène	6
2.2 Les défenses antioxydantes	7
2.3 Les protéines de stress	9
2.4 Le stress oxydatif et le cadmium	10
2.5 Le stress oxydatif et le zinc	11
CHAPITRE III	
L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL	12
3.1 Les cellules de l'épithélium intestinal	12
3.2 Les mécanismes de transport des entérocytes	14
3.3 Le transport de cadmium par l'épithélium intestinal	14

CHAPITRE IV

LA LIGNÉE CELLULAIRE CACO-2	16
4.1 Le choix de la lignée cellulaire Caco-2	16
4.2 La lignée cellulaire Caco-2 et le cadmium	17
4.3 La lignée cellulaire Caco-2 et le stress oxydatif	19

CHAPITRE V

ARTICLE: ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN CADMIUM-INDUCED ADAPTATION MECHANISMS IN PROLIFERATIVE CACO-2 CELLS	21
5.1 Abstract	22
5.2 Introduction	23
5.3 Materials and methods	25
5.3.1 Cell culture	25
5.3.2 Preparation of cadmium and zinc stock solutions	25
5.3.3 Cell viability measurement	25
5.3.4 Uptake measurement of ^{109}Cd	26
5.3.5 RT-PCR analysis	26
5.3.6 Enzymatic activity assays	27
5.3.7 Thiol content measurements	28
5.3.8 Apoptosis analysis	28
5.3.9 Statistics	28
5.4 Results	30
5.4.1 Effect of a pre-exposure to Cd on cellular sensitivity to Cd	30
5.4.2 MT-IIa and HSP70 expression in cells pre-exposed to Cd	30
5.4.3 Cellular glutathione and thiol contents following pre-exposure to Cd	31
5.4.4 Catalase and glutathione peroxidase activities	32
5.4.5 Effect of a pre-exposure to Zn on cellular sensitivity to Cd	32
5.5 Discussion	33
5.5.1 Induction of resistance to Cd varies with the differentiation status	33
5.5.2 Expression of stress proteins is not responsible for the acquired resistance ...	33
5.5.3 Oxidative stress impairs the induction of resistance to Cd	34
5.5.4 Conclusion	36
5.5.5 Acknowledgements	36

5.6 References	37
5.7 Legends to figures	40
5.8 Figures	43
CHAPITRE VI	
DISCUSSION	58
6.1 Retour sur les hypothèses	58
6.2 Retour sur la méthodologie	59
6.3 Perspectives	60
CONCLUSION	62
RÉFÉRENCES	63

LISTE DES FIGURES

Figure		Page
2.1	Production et élimination d'espèces réactives de l'oxygène soit: le $O_2^{\bullet-}$, le H_2O_2 et le OH^{\bullet}	8
2.2	Synthèse <i>de novo</i> du glutathion à partir de glutamate, de cystéine et de glycine	9
3.1	Organisation des quatre types de cellules différenciées et des cellules souches de cryptes, le long de l'axe crypte-villosité dans l'intestin grêle	13
5.1	Effect of a pre-exposure to 10 or 20 μM Cd on MTT activity used as viability assay for a) proliferative 7-day-old cells, b) differentiated 21-day-old cells, c) LC50 values as a function of increasing pre-exposure concentrations of Cd ..	43
5.2	Effect of time of pre-incubation with 10 μM Cd on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd	44
5.3	Effect of a pre-exposure to 10 μM Cd on ^{109}Cd uptake in proliferative cells ..	45
5.4	Effect of an exposure to 10 μM Cd on MT-IIa and HSP70 mRNAs levels in proliferative and differentiated cells, as measured with RT-PCR, showing a) qualitative results on 2 % agarose gel and b) densitometry analyses of mRNA induction	46
5.5	Effect of pretreatment with 1 μM CHX and 10 μM Cd on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd	47
5.6	Effect of exposure to 10 μM Cd on intracellular reduced thiol content in proliferative and differentiated cells	48
5.7	Effect of pretreatment with 3 mM BSO and 10 μM Cd on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd	49
5.8	Effect of pretreatment with 30 μM diamide, 30 μM BCNU and 10 μM Cd on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd	50
5.9	Effect of exposure to Cd on CAT activity	51
5.10	CAT and GPx activity in 7-day-old proliferative cells measured as rate of decrease of hydrogen peroxide (CAT) and of cumene hydroperoxide (GPx) ..	52
5.11	Effect of pretreatment with 100 mM 3AT and 10 μM Cd on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd	53
5.12	Effect of pretreatment to 100 μM Zn or 10 μM Cd on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd	54
5.13	Effect of pretreatment with 1 μM CHX and 100 μM Zn on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd	55
5.14	Effect of pretreatment with 3 mM BSO and 100 μM Zn on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd	56

Figure		Page
5.15	Effect of pretreatment with 100 mM 3AT and 100 μ M Zn on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3AT	3-amino-1,2,4-triazole
ANOVA	Analyse de variance
BCNU	1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea
BSO	L-buthionine sulfoximine
Ca	Calcium
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
CHX	Cycloheximide
Cu	Cuivre
DMEM	Milieu minimum essentiel d'aigle de Dulbecco modifié
DMT1	Transporteur ion-métal divalent 1
FBS	Sérum bovin foetal
Fe	Fer
FITC	Fluorescéine isothiocyanate
GSH	Glutathion réduit
GSH-Px	Glutathion peroxydase
GSSG	Glutathion oxydé
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HSP	Protéine de choc thermique
Mn	Manganèse
MT	Métallothionéine
MTT	3-[4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Nramp2	Protéine associée à la résistance naturelle du macrophage 2
O ₂ • ⁻	Anion superoxyde
OH•	Radical hydroxyl
RT-PCR	Transcriptase inverse – Réaction en chaîne par polymérase
siRNA	Petit ARN interférant
SOD	Superoxyde dismutase
Zn	Zinc

LISTE DES SYMBOLES

LC50	Concentration létale 50 %
Hillslope	Pente de la courbe
SD	Écart-type
Y_{\max}	Valeur de Y maximale
Y_{\min}	Valeur de Y minimale

RÉSUMÉ

Le cadmium (Cd) est un métal toxique, inducteur de stress oxydatif, dont la principale source de contamination pour l'humain non-fumeur est la nourriture. L'épithélium intestinal est la première barrière de l'organisme franchie par le Cd ingéré. Lors de sa phase proliférative, la lignée cellulaire Caco-2 est représentative des précurseurs d'entérocytes et, lors de sa phase différenciée, des entérocytes matures de l'épithélium intestinal. Un prétraitement de 24 h à 10 μ M de Cd induit une tolérance au Cd dans les cellules prolifératives, mais pas dans les cellules Caco-2 différenciées alors que ces dernières sont, de façon naturelle, moins sensibles. Les objectifs de cette étude sont d'évaluer, en fonction du stade de différenciation entérocytaire, le rôle du stress oxydatif dans l'induction de cette tolérance et dans la toxicité aiguë du Cd, ainsi que de comparer la tolérance induite par le Zinc (Zn) à celle induite par le Cd. Les hypothèses de cette étude sont: i) le stress oxydatif est impliqué dans le mécanisme de résistance acquise des cellules prolifératives, ii) la MT-IIa et la HSP70 ne sont pas essentielles à ce processus de résistance et iii) les résistances acquises induites par le Zn et le Cd impliquent des processus différents. La méthodologie de cette étude comprend des techniques de culture cellulaire, des tests de viabilité cellulaire, des analyses d'expression de la MT-IIa et de la HSP70 par RT-PCR, des dosages de contenus en thiols intracellulaires et d'activité de la catalase (CAT) et de la glutathion peroxidase (GSH-Px), des mesures d'accumulation cellulaire de ^{109}Cd et des analyses de type de mort cellulaire par cytofluorimétrie de flux. Les résultats montrent que l'inhibition de la catalase par 100 mM de 3-amino-1,2,4-triazole (3AT) empêche l'induction de la résistance acquise et provoque une sensibilisation des cellules prolifératives prétraitées au Cd, mais pas des cellules témoins. Cependant, l'inhibition de la synthèse de glutathion par 3 mM de L-buthionine sulfoximine (BSO) ainsi que de la synthèse protéique par 1 μ M de cycloheximide (CHX) ne préviennent pas l'induction de cette résistance, mais elles sensibilisent les cellules à la toxicité aiguë du Cd. Contrairement à 10 μ M de Cd, un prétraitement de 24 h à 100 μ M de Zn en co-exposition avec 100 mM 3AT induit une résistance acquise. Enfin, l'induction de la MT-IIa et de la HSP70 ne semble pas nécessaire au mécanisme de résistance acquise bien qu'un prétraitement au Cd ou au Zn augmentent les niveaux d'ARNm de ces deux protéines. En conclusion, les cellules Caco-2 répondent différemment à une exposition à une faible concentration de Cd selon leur état de différenciation et la présence de catalase active semble essentielle à l'induction, par le Cd mais pas par le Zn, d'une résistance acquise des cellules prolifératives à une exposition subséquente au Cd.

Mots clés: Cadmium, stress oxydatif, épithélium intestinal, cellules Caco-2, résistance acquise.

INTRODUCTION

Le cadmium (Cd) est un métal toxique non-essentiel, inducteur de stress oxydatif, dont la principale source d'exposition chez l'humain non-fumeur est la nourriture. L'épithélium intestinal est donc la première barrière de l'organisme à franchir par le Cd ingéré. Cet épithélium est complexe et est formé de plusieurs types cellulaires, dont les entérocytes qui sont les cellules responsables de l'absorption sont les plus abondantes le long des villosités de l'intestin grêle. La lignée cellulaire Caco-2, dérivée d'un adénocarcinome du colon humain, est utilisée dans cette étude car elle a la particularité de se différencier spontanément à confluence des cultures, et de passer d'un stade prolifératif représentatif des précurseurs d'entérocytes à un stade différencié représentatif des entérocytes. Il est donc intéressant d'étudier les effets du Cd sur ces cellules en fonction du stade de différenciation entérocytaire, ce qui à notre connaissance n'a pas été fait. À ce sujet, des études préliminaires ont démontré qu'une résistance au Cd est acquise dans les cellules Caco-2 prolifératives lors d'un prétraitement (c'est-à-dire une exposition préalable de 24 h) à 10 μ M Cd, alors que cette résistance est impossible à induire, même à de plus hautes concentrations de Cd, dans les cellules différenciées. L'objectif de cette étude est donc d'évaluer le rôle du stress oxydant dans les mécanismes de résistance acquise ainsi que dans la toxicité aiguë du Cd, en fonction du stade de différenciation entérocytaire dans les cellules Caco-2, ce qui à notre connaissance n'a jamais été fait dans le passé. Les différences entre l'induction d'une résistance acquise par le Cd et par le zinc (Zn) seront aussi étudiées.

Pour atteindre ces objectifs, la méthodologie utilisée comprend des techniques de culture cellulaire, des analyses de viabilité cellulaire par mesures de réduction de 3-[4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), des analyses par transcriptase inverse - réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR) d'expression d'ARNm de protéines de stress, soit la métallothionéine-IIa (MT-IIa) et la protéine de choc thermique 70 (HSP70), des mesures d'activités de la catalase (CAT) et de la glutathion peroxydase (GSH-

Px), des quantifications de thiols intracellulaires, des mesures d'accumulation cellulaire de ^{109}Cd et des analyses par cytofluorométrie de flux déterminant si les cellules sont mortes par apoptose ou par nécrose. Les résultats obtenus dans différentes conditions expérimentales modulant la réponse au stress oxydatif permettront d'évaluer le rôle de ce stress et de mieux cerner les mécanismes de toxicité aiguë du Cd de même que ceux impliqués dans l'induction d'une résistance acquise.

Les hypothèses principales émises dans cette étude sont: i) le stress oxydatif est impliqué dans le mécanisme de résistance acquise des cellules prolifératives, ce qui se justifie très bien étant donné que le Cd est un inducteur de stress oxydatif, ii) la MT-IIa et la HSP70 ne sont pas essentielles au processus de résistance acquise des cellules prolifératives puisqu'il a été démontré qu'une résistance au Cd peut être maintenue après que les niveaux de MT intracellulaires redescendent aux niveaux de base et iii) les résistances acquises induites par le Zn et le Cd impliquent des processus différents étant donné que le Zn est reconnu pour son potentiel antioxydant contrairement au Cd qui est un inducteur de stress oxydatif.

Seront présentées dans ce document: i) une revue de la littérature abordant les thèmes du cadmium, du stress oxydatif, de l'épithélium intestinal et de la lignée cellulaire Caco-2, ii) l'essentiel des résultats obtenus présentés sous forme d'article, iii) une discussion sur les hypothèses, la méthodologie et les perspectives de cette étude et iv) une conclusion générale.

CHAPITRE I

LE CADMIUM COMME POLLUANT ENVIRONNEMENTAL

1.1 Généralités

Le cadmium (Cd) est un métal de transition toxique non-essentiel et est le 48^{ème} élément du tableau périodique. Il fait partie du groupe IIb, dont font également partie le Zn et le mercure. Il ne possède qu'un seul état oxydé, soit +2. Sa découverte date de 1808.

Les sources de Cd dans l'environnement sont multiples. Il est utilisé, entre autres, pour la fabrication de batteries nickel-Cd, ainsi que de peintures et de plastiques contenant des pigments ou des stabilisants à base de Cd, en plus d'être présent dans le tabac et dans les fertilisants à base de phosphate et d'être largué dans l'atmosphère lors de la combustion de combustibles fossiles ou de la production de certains métaux comme le Zn et le fer (Fe) (WHO, 1992; Watkin *et al.*, 2003).

La nourriture est la principale source d'exposition au Cd chez l'humain non-fumeur. La contamination de sa nourriture vient du fait que les plantes absorbent le Cd qui se retrouve dans les sols à cause de la pollution atmosphérique et des fertilisants à base de phosphate. Le Cd est ensuite bioaccumulé dans la chaîne alimentaire (WHO, 1992). La consommation d'abats est particulièrement risquée car le Cd s'accumule dans ces tissus (Van Oostdam *et al.*, 1999). Le Cd est un des rares métaux communément présent dans la nourriture qui n'a aucun rôle dans la nutrition (Goyer, 1995). Sa consommation quotidienne acceptable est de 1 µg/Kg/jour (WHO, 1989).

Le Cd ingéré est peu absorbé, sa biodisponibilité orale étant inférieure à 5 % (Elinder, 1992). Cette absorption se fait principalement dans le duodénum et dans le jéjunum proximal

à cause du pH plus faible à ces endroits, possiblement parce que plusieurs espèces de Cd différentes coexistent à ce pH (Andersen *et al.*, 1994). Cependant, le Cd qui traverse l'épithélium intestinal pénètre dans la circulation sanguine où il se lie principalement à l'albumine et quelque fois à d'autres protéines plasmatiques ou aux érythrocytes. Il est ensuite accumulé dans le foie où il induit la synthèse de MT auxquelles il se lie. Le Cd lié à la MT est ensuite accumulé dans les reins où il est graduellement éliminé (Nordberg, 1984; Klaassen, 2001). Le Cd lié à la MT demeure très longtemps stocké dans les reins. La demi-vie du Cd chez l'humain varie entre 15 et 20 ans (Jacobs et Wood, 2004).

1.2 La toxicité du cadmium

Bien que la découverte du Cd date de 200 ans, le Cd n'a commencé à être reconnu comme étant un toxique environnemental que dans les années 1950, quelques années après l'apparition de la maladie itai-itai au Japon. Cette maladie est survenue suite aux déversements de déchets de fonderie contenant des concentrations élevées de Cd qui ont contaminé le riz des habitants de la région (Fleischer *et al.*, 1974). Les effets toxiques observés lors de cette maladie sont des troubles osseux tels que l'ostéomalacie et l'ostéoporose, ainsi que des troubles rénaux (Klaassen, 2001). Le nom de cette maladie signifie d'ailleurs « aïe aïe » et est associé à la douleur osseuse des malades.

De nos jours, la toxicité du Cd est beaucoup mieux connue, malgré que de très nombreuses questions demeurent. De nombreux mécanismes sont suggérés pour expliquer la toxicité du Cd dont l'inhibition d'enzymes anti-oxydantes comme la CAT et la superoxyde dismutase (SOD), la peroxydation des lipides et la modification possible de l'ADN (Casalino *et al.*, 2002). D'ailleurs, le Cd est aujourd'hui classé comme un carcinogène de type 1, c'est-à-dire qu'il est considéré comme carcinogène chez l'humain avec suffisamment de preuves pour qu'il ne subsiste pas de doute (IARC, 1993). Les mécanismes principaux de toxicité du Cd seraient cependant de diminuer la quantité de glutathion (GSH) intracellulaire et de se lier aux groupements thiols des protéines (Valko *et al.*, 2005). Le Cd peut théoriquement causer une mortalité cellulaire par apoptose ou par nécrose selon la concentration, la durée d'exposition et le type cellulaire. De ce fait, l'ajout d'un inhibiteur de la Jun N-terminal

kinase, une enzyme impliquée dans l'apoptose, protège les cellules contre la mortalité induite par le Cd (Lau *et al.*, 2006).

L'organe cible principal de la toxicité du Cd à long terme est le rein. Le complexe Cd-MT formé dans le foie permet de protéger celui-ci de la toxicité du Cd, malheureusement il est également responsable de la longue demi-vie du Cd (Klaassen et Liu, 1997). En effet, ce complexe est réabsorbé par le rein et sa dégradation cause la libération de Cd sous sa forme ionique ce qui induit la synthèse de MT. Ce cycle perdure jusqu'au moment où trop de Cd est accumulé dans le rein, causant une néphrotoxicité (Fowler, 1993). Cette néphrotoxicité se manifeste par une dégénérescence des cellules tubulaires suivie d'une éventuelle fibrose (Klaassen, 2001). La toxicité du Cd peut cependant affecter d'autres organes et tissus que les reins et les os, le Cd étant également considéré toxique notamment pour le foie, les poumons, les testicules et le cerveau (WHO, 1992).

Plusieurs autres informations sont disponibles sur la toxicité du Cd. Celles pertinentes à ce projet de recherche seront approfondies dans les chapitres suivants.

CHAPITRE II

LE STRESS OXYDATIF

2.1 Les espèces réactives de l'oxygène

L'importance du stress oxydatif n'est plus à démontrer. En effet, celui-ci serait impliqué dans de nombreuses problématiques comme le vieillissement cellulaire, l'asthme, l'apoptose et le cancer, tout en pouvant causer des dommages sur les protéines, les acides nucléiques et les lipides cellulaires (Moller et Kristensen, 2004; Afonso *et al.*, 2007; Ishii, 2007). Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être produites dans n'importe quel type cellulaire, et ce même en conditions normales (Rutkowski *et al.*, 2007). Trois de ces espèces réactives de l'oxygène seront décrites ici, soit l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl (OH^{\bullet}).

Ces trois molécules sont formées selon un ordre bien précis. Tout d'abord, les $O_2^{\bullet-}$ sont produits suite à une réduction de l'oxygène (O_2), principalement causée par des électrons s'étant échappés du système de transport d'électrons présent dans la mitochondrie (Ishii, 2007). Le $O_2^{\bullet-}$ est d'une importance capitale car il est la première espèce réactive d'oxygène à être formée. Certains complexes ont été identifiés comme sites de production possible de $O_2^{\bullet-}$ dans la mitochondrie, et l'importance physiologique commence à être déterminée. En effet, comparativement aux complexes III et IV, une inhibition de seulement 25 % du complexe I (NADH ubiquinone oxydoréductase) est suffisante pour provoquer une formation d'espèces réactives ce qui peut théoriquement avoir des conséquences physiologiques (Adam-Vizi, 2005). Les $O_2^{\bullet-}$ agissent en oxydant certains cofacteurs comme, par exemple, le groupement Fe-S de l'aconitase qui est une enzyme du cycle de Krebs (Ilbert *et al.*, 2006). Ils inhibent donc la production d'ATP cellulaire. De plus, en présence d'oxyde nitrique (NO), ils

provoquent la formation d'une espèce réactive de l'azote, l'oxynitrite (OONO^\cdot), qui est bien plus réactive que les O_2^\cdot et qui peut endommager de très nombreuses molécules (Murphy, 1999).

Cet O_2^\cdot est transformé par la SOD en deux étapes. Premièrement, le métal constituant du site actif de l'enzyme (soit Fe^{3+} , Cu^{2+} ou Mn^{3+}) est réduit en transformant un O_2^\cdot en O_2 , et ensuite ce métal est oxydé en présence de deux protons, transformant un second O_2^\cdot en H_2O_2 (Johnson et Giulivi, 2005). Le H_2O_2 oxyde les groupements thiols des résidus cystéines (Ilbert *et al.*, 2006). Il est à noter que le H_2O_2 peut diffuser à travers la membrane cellulaire (Afonso *et al.*, 2007).

Le OH^\cdot n'est pas spécifique et est l'espèce réactive d'oxygène la plus dangereuse et la plus réactive (Shi *et al.*, 2005). En effet, il réagit très rapidement avec son environnement, sa demi-vie étant de 10^{-9} seconde, en comparaison, le O_2^\cdot et le H_2O_2 sont beaucoup plus stables (Bossé *et al.*, 2003). Les OH^\cdot sont produits par la réaction de Fenton qui est une réaction de dismutation se produisant en présence de certains métaux possédant deux états de transition différents (Ullrich et Kissner, 2006). Le métal doit donc être sous sa forme oxydée pour catalyser cette réaction.

2.2 Les défenses antioxydantes

Les espèces réactives de l'oxygène étant produites naturellement par le métabolisme cellulaire, de bons mécanismes de défense sont nécessaires afin d'obtenir un équilibre entre oxydants et antioxydants. Parmi ceux-ci il y a des enzymes antioxydantes, des molécules antioxydantes naturellement produites par l'organisme et des antioxydants exogènes.

Quatre enzymes antioxydantes sont très importantes dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène. Tout d'abord il y a la SOD, mentionnée précédemment qui transforme les O_2^\cdot en H_2O_2 . Ce dernier doit ensuite être transformé avant d'affecter les protéines possédant des thiols ou d'être transformé en OH^\cdot . Deux enzymes peuvent détoxifier l'organisme du H_2O_2 soit la CAT et la GSH-Px qui utilise le GSH comme agent réducteur (Klaassen, 2001). Finalement, il est également possible de considérer comme enzyme antioxydante la glutathion réductase qui réduit le glutathion oxydé (GSSG) afin de permettre aux cellules de conserver un ratio GSH/GSSG supérieur à cent pour un en conditions

normales (Voet et Voet, 1995). Il est à noter que les $\text{OH}\cdot$ ne sont pas comme tel transformés. En effet, ils sont tellement réactifs et leur demi-vie est tellement courte qu'une détoxification est impossible. La production et l'élimination des espèces réactives de l'oxygène mentionnées par les enzymes antioxydantes sont schématisées à la figure 2.1.

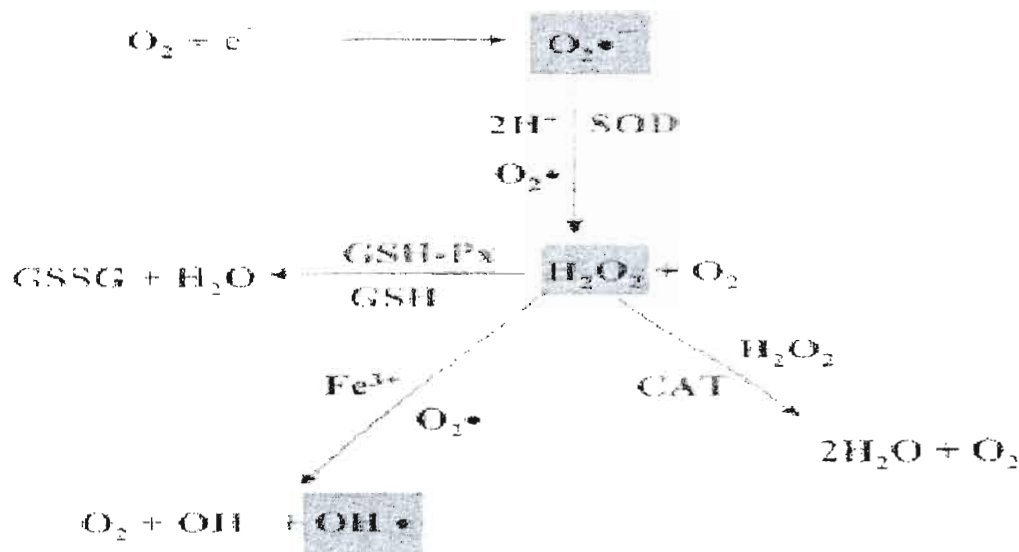


Figure 2.1 Production et élimination d'espèces réactives de l'oxygène soit: l'anion superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl ($\text{OH}\cdot$). Leur transformation se fait à l'aide des enzymes de détoxification soit: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH-Px) qui oxyde également le glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). (Tirée de Klaassen, 2001.)

Deux types de molécules présentes dans l'organisme jouent un rôle important dans la défense antioxydante soit les protéines plasmatiques et le GSH. Les protéines plasmatiques peuvent chélater les métaux de transition (Zablocka et Janusz, 2008). Elles peuvent donc prévenir la réaction de Fenton. Le GSH peut protéger les cellules contre le stress oxydant de deux façons. Il peut être utilisé par la GSH-Px pour détoxifier l'organisme du H_2O_2 et d'autres peroxydes tel que mentionné précédemment. Il est également la réserve intracellulaire de thiols la plus importante et peut ainsi lier certains métaux générateurs de stress oxydant en créant des liaisons thiol-métal (Sun *et al.*, 2005). Le GSH peut provenir de sources extracellulaires, mais il peut également être produit *de novo* à partir de cystéine, de glutamate et de glycine, la réaction limitante de cette synthèse étant catalysée par la γ -

glutamylcystéine synthétase (Alhamdani, 2005; Aw, 2005). Cette synthèse est schématisée à la figure 2.2.

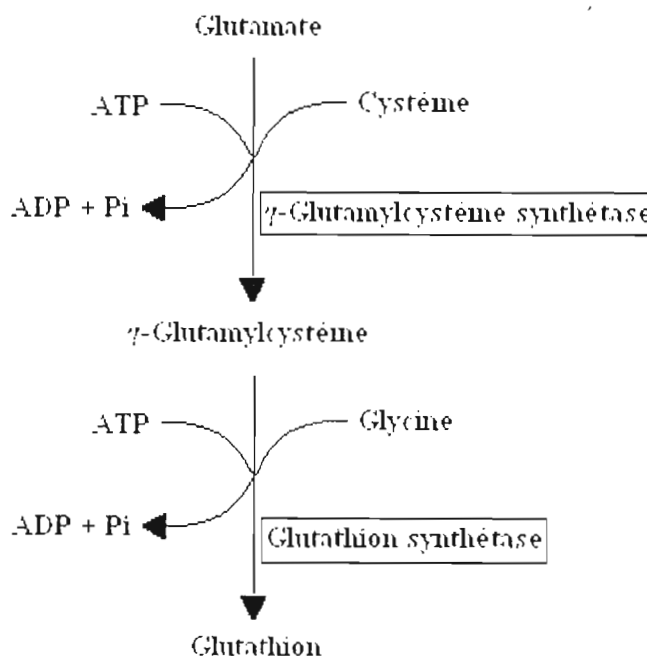


Figure 2.2 Synthèse *de novo* du glutathion à partir de glutamate, de cystéine et de glycine. Les enzymes impliquées sont la γ -glutamylcystéine synthétase et la glutathion synthétase.

Les antioxydants exogènes sont très nombreux et des livres entiers ont été publiés sur leur différents rôles ainsi que sur l'importance d'avoir une bonne alimentation. En font partie, entre autres, les polyphénols, la bêta-carotène, le Zn, le sélénium, ainsi que les vitamines A, B₆, C et E (Hsu et Guo, 2002; Hamilton, 2007; Zablocka et Janusz, 2008).

2.3 Les protéines de stress

Deux types de protéines de stress seront étudiés, soit les MT et les HSP.

Les MT sont des protéines dont le rôle principal est de protéger les cellules contre la toxicité des métaux, essentiels ou non, en effectuant des liaisons thiol-métal avec les ions métalliques grâce à leurs résidus cystéines, et qui sont induites par de très nombreux facteurs, dont le stress oxydatif ainsi que par plusieurs métaux dont le Cd (Samson et Gedamu, 1998; Kameoka et al., 1999; Hawse *et al.*, 2006). Les MT sont également des éboueurs de O₂^{•-}, de H₂O₂ et de OH[•] (Wong *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2005). Les deux isoformes les plus

induites en présence de Cd sont la MT-IIa et la MT-Ix (Miura et Koizumi, 2007). La MT-IIa, sur laquelle plus d'informations sont disponibles, est considérée dans cette étude.

Les HSP sont des chaperons moléculaires s'associant aux autres protéines afin de les protéger d'agents pouvant affecter leur conformation ou leur maturation (Huang *et al.*, 1994). De plus, elles stabilisent les peptides et facilitent la réparation ou la dégradation des protéines intracellulaires endommagées lors d'un stress (Kiang et Tsokos, 1998; Parikh, *et al.*, 1998). Tout comme les MT, les HSP sont induites par de très nombreux facteurs, dont les chocs thermiques, le stress oxydatif et plusieurs métaux dont le Cd (Kiang et Tsokos, 1998). La HSP la mieux connue et la mieux conservée durant l'évolution est la HSP70 (Urani *et al.*, 2005). La HSP70 est considérée dans cette étude.

2.4 Le stress oxydatif et le cadmium

Le Cd est un inducteur de stress oxydatif dont le mécanisme exact d'induction d'espèces réactives d'oxygène n'est toujours pas connu. Cependant, il a été démontré qu'il se produit une accumulation de H_2O_2 lors d'une exposition cellulaire au Cd (Schützendübel *et al.*, 2001). En fait, les mécanismes d'action du Cd semblent être multiples. Les trois principales hypothèses de mécanismes d'action émises sont: i) la libération du Fe de ses sites de liaison causée par le Cd, le Fe étant un métal de Fenton qui peut amener la production de OH^\bullet en présence de H_2O_2 , ii) la liaison du Cd aux groupements sulfhydryls de certaines molécules comme le GSH et iii) l'inhibition de la chaîne de transport d'électrons amenant une accumulation de semiubiquinones formant des $O_2^{\bullet-}$ (Casalino *et al.*, 1997; Souza *et al.*, Acute cadmium..., 2004; Wang *et al.*, 2004).

Le Cd ne fait pas qu'induire un stress oxydatif, il réduit aussi les défenses antioxydantes de la cellule. En effet, il inhibe les trois enzymes détoxifiantes des espèces réactives de l'oxygène prémentionnées soit la SOD, la CAT et la GSH-Px (Szuster-Ciesielska *et al.*, 2000; Elbekai et El-Kadi, 2005; Liu *et al.*, 2005). De plus, la liaison du Cd au GSH diminue la quantité de GSH disponible.

Finalement, le Cd est un inducteur des MT et HSP comme mentionné précédemment. Cette induction est très rapide et des niveaux très élevés de MT-IIa et de HSP70 sont observés après six heures d'exposition ou moins à une concentration de seulement 1 μM pour

la MT-IIa et 5 μM pour la HSP70 (Murata *et al.*, 1999; Souza *et al.*, Acute cadmium..., 2004). Évidemment l'induction de ces protéines est positive pour la cellule. Par contre, le Cd peut former des espèces réactives de l'oxygène, notamment des $\text{OH}\cdot$, à partir de certaines MT, en libérant les métaux qu'elles contiennent (O'Brien et Salacinski, 1998).

2.5 Le stress oxydatif et le zinc

Le stress oxydatif peut être induit par le Cd, mais il peut également être prévenu par le Zn. Il est intéressant de comparer les mécanismes de résistance induits par le Zn, anti-oxydant, et par le Cd pro-oxydant.

Pour prévenir le stress oxydatif, le Zn peut: i) stabiliser la membrane cellulaire, ii) induire des MT, iii) faire partie d'une SOD, soit la CuZnSOD, et iv) se lier à des cystéines afin d'augmenter la réactivité de celles-ci avec le H_2O_2 (Szuster-Ciesielska *et al.*, 2000; Ilbert *et al.*, 2006). Des cellules prétraitées durant 24 h avec 60 μM Zn sont d'ailleurs tolérantes au Cd: le prétraitement au Zn permet de prévenir la diminution des niveaux de GSH et d'activité enzymatique de la CAT et de la GSH-Px par le Cd (Souza *et al.*, Zinc pretreatment..., 2004). De plus, une nette diminution de la production de $\text{O}_2\cdot^-$ par le Cd est observée lors d'un co-traitement avec une concentration physiologique de Zn, soit 10 μM dans le milieu de culture durant 24 heures, dans des cellules humaines (Szuster-Ciesielska *et al.*, 2000). Il a aussi été démontré que l'induction de la MT n'est pas le seul facteur impliqué dans l'induction d'une tolérance au Cd par le Zn puisque celle-ci est également observée chez des souris *MT-null* qui ne produisaient ni MT-1, ni MT-2 (Tang *et al.*, 1998).

CHAPITRE III

L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL

3.1 Les cellules de l'épithélium intestinal

Les cellules de l'épithélium intestinal peuvent être divisées en deux grandes catégories distinctes, soit les cellules souches de cryptes et les cellules différenciées. Ces cellules forment un tissu organisé dont le rôle est d'absorber les nutriments tout en limitant l'entrée d'agents néfastes pour l'organisme.

Les cellules souches de cryptes sont les cellules responsables de la régénération de l'épithélium intestinal. Ce sont des cellules multipotentes pouvant se remplacer, chaque crypte étant donc pleinement autonome (Leoffler *et al.*, 1993). Ces cellules prolifèrent très rapidement. Chez la souris, une crypte contenant 250 cellules produit environ 300 nouvelles cellules par jour (Leoffler *et al.*, 1993). Les cellules progénitrices produites permettent le renouvellement des cellules différenciées des villosités avoisinantes. Le renouvellement d'une villosité par les cellules souches de cryptes se fait en seulement environ trois jours, tandis que le renouvellement des cellules de Paneth se fait en environ quinze jours (Karam, 1999).

Ce renouvellement rapide des cellules de l'épithélium intestinal est très important physiologiquement. En effet, il permet de protéger l'organisme contre les pathogènes en éliminant rapidement et de manière naturelle les cellules infectées (Cuénod-Jabri *et al.*, 1997). Cette protection naturelle peut également s'appliquer aux contaminants comme le Cd.

Il y existe quatre types de cellules différenciées soit: i) les cellules en gobelet qui produisent les protéines nécessaires à la croissance et à la réparation de l'épithélium et qui sont également connues sous le nom de cellules à mucus, ii) les cellules neuroendocrines qui

excrètent des hormones, iii) les cellules de Paneth qui sécrètent des facteurs de croissance et certaines enzymes, ainsi que iv) les entérocytes qui ont un rôle d'absorption et qui représentent la majorité des cellules des villosités (Snoeck *et al.*, 2005). L'organisation des divers types cellulaires présents le long de l'axe crypte-villosité peut être observée à la figure 3.1.

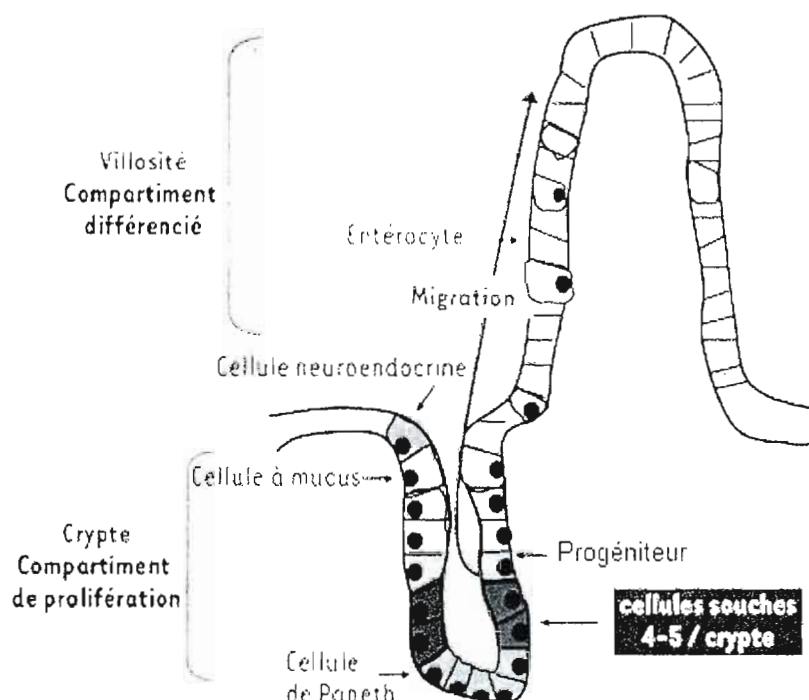


Figure 3.1 Organisation des quatre types de cellules différenciées et des cellules souches de cryptes, le long de l'axe crypte-villosité dans l'intestin grêle. (Tirée de Andreu *et al.*, 2006.)

Les cellules de Paneth ne migrent pas et se situent au bas de la crypte, cependant, les entérocytes, les cellules en gobelet et les cellules neuroendocrines migrent le long des villosités durant leur différenciation, jusqu'à atteindre le haut de la villosité faisant face à la lumière intestinale et entrer en apoptose (Andreu *et al.*, 2006). L'apoptose est d'une importance capitale afin de compenser le rythme de prolifération très élevé de cet épithélium. Cette apoptose, en conditions normales, ne se produit d'ailleurs qu'à l'extrémité supérieure des villosités (Hall *et al.*, 1994). Lorsque la mort cellulaire se produit par perte d'adhésion impliquant les intégrines, elle se nomme anoikis et provoque la chute des cellules

épithéliales. Ce phénomène serait moins important physiologiquement que l'apoptose (Hall *et al.*, 1994).

3.2 Les mécanismes de transport des entérocytes

Les entérocytes sont des cellules dont le rôle est de permettre le passage des nutriments. Elles sont polarisées, c'est-à-dire qu'elles ont une membrane apicale et une membrane basolatérale différentes reliées par des jonctions serrées, et forment une monocouche. En conditions normales, leurs jonctions serrées qui séparent les membranes apicale et basolatérale préviennent le transport paracellulaire des macromolécules, forçant celles-ci à emprunter une voie de transport transcellulaire, permettant une sélection du côté apical (Snoeck *et al.*, 2005). De plus, la membrane apicale possède des microvillosités très rapprochées, formant une bordure en brosse qui contient des hydrolases digestives et des transporteurs spécifiques. La membrane apicale peut empêcher l'entrée de certaines molécules trop grandes ou bloquées par la charge négative des microvillosités (Maury *et al.*, 1995; Snoeck *et al.*, 2005).

Les macromolécules et les nutriments utilisent des voies de transport différentes pour entrer dans les entérocytes. Les macromolécules traversent la membrane apicale des entérocytes par endocytose, principalement par endocytose dépendante de clathrines, alors que les nutriments, dont les ions font partie, utilisent des transporteurs présents dans la membrane cellulaire (Snoeck *et al.*, 2005).

3.3 Le transport de cadmium par l'épithélium intestinal

Lors d'une contamination par la voie gastro-intestinale, une absorption de Cd dans le petit intestin a été démontrée, même si les mécanismes impliqués dans le transfert de la lumière intestinale jusqu'à la circulation sanguine ne sont toujours pas clairement définis (Jacobs et Wood, 2004). De récentes études ont cependant montré une modulation du transport de Cd par le Zn dans les cellules humaine de cryptes intestinales HIEC (Bergeron et Jumarie, 2006). D'autres hypothèses impliquent une compétition avec le calcium (Ca) ou le Fe (Jacobs et Wood, 2004). Il est à noter que tous ces métaux ont comme point commun une forme cationique divalente.

Un exemple de transporteur probable de Cd dans les entérocytes est le transporteur *Divalent metal-ion transporter 1* (DMT1). Dans les entérocytes, l'expression de DMT1, qui est un transporteur de Fe, serait corrélée avec les niveaux de transport de Cd, soutenant l'hypothèse d'une relation entre l'absorption intestinale de ces deux métaux (Tallkvist *et al.*, 2001). Ce transport n'expliquerait cependant pas le lien entre l'absorption de Cd et celles du Zn et du Ca puisqu'il est très peu efficace pour le Ca et le Zn divalents (Mackenzie *et al.*, 2007). Un résultat semblable a également été observé dans la lignée cellulaire Caco-2 avec le transporteur *Natural resistance-associated macrophage protein 2* (Nramp2) qui est l'homologue humain de DMT1 et qui permet le transport de Cd, sous sa forme Cd^{2+} , dans l'entérocyte, également en compétition avec le Fe et non avec le Zn (Tandy *et al.*, 2000; Elisma et Jumarie, 2001).

Malgré la recherche toujours nécessaire sur les mécanismes de transport du Cd dans l'épithélium intestinal, cette étude n'a pas comme objectif d'étudier celui-ci en tant que tissu d'absorption ou en tant que barrière contre la contamination de l'organisme au Cd. L'épithélium intestinal est étudié ici en tant que cible d'une toxicité aiguë du Cd. Peu de travaux ont étudié cette toxicité *in vivo*. Il a cependant été démontré que le Cd, à une dose élevée de 50,2 mg Cd/Kg de nourriture, est cytotoxique pour l'épithélium intestinal par peroxydation des lipides, inflammation et production de stress oxydatif (Berzina *et al.*, 2007).

L'importance de cette toxicité a également été démontrée *in vitro*. En effet, le Cd cause des dommages autant cellulaires que moléculaires et diminue la résistance électrique transépithéliale augmentant ainsi la perméabilité paracellulaire (Boveri *et al.*, 2004). Ces dommages sont très graves puisqu'ils altèrent le fonctionnement normal de l'épithélium, modifiant ses capacités d'absorption et de barrière protectrice. De plus, un dommage au niveau du renouvellement de l'épithélium serait très problématique physiologiquement et pourrait perturber ces mêmes fonctions.

CHAPITRE IV

LA LIGNÉE CELLULAIRE CACO-2

4.1 Le choix de la lignée cellulaire Caco-2

La lignée cellulaire Caco-2 est utilisée dans cette étude étant donné la difficulté d'obtenir des cultures primaires de cellules intestinales différenciées, puisqu'elles ne peuvent être obtenues qu'à partir de cellules fœtales (Perreault et Beaulieu, 1998).

La lignée cellulaire Caco-2 a été isolée, il y a environ trente ans, avec plusieurs autres lignées cellulaires cancéreuses dans le but d'aider les études sur le cancer (Fogh, 1977). Cette lignée cellulaire humaine a par la suite été étudiée plus en profondeur et il a été démontré qu'elle forme des monocouches d'entérocytes polarisés se différenciant spontanément à confluence et exprimant plusieurs caractéristiques majeures des entérocytes du petit intestin, dont la formation de jonctions serrées (Pinto *et al.*, 1983; Meunier *et al.*, 1995). L'utilisation de cette lignée cellulaire semble donc pertinente dans toute étude menée sur l'épithélium intestinal humain. Il a également été démontré que, suite à leur différenciation spontanée, les cellules Caco-2 expriment la sucrase-isomaltase, une protéine présente uniquement dans la bordure en brosse des cellules différenciées de l'épithélium intestinal (Zweibaum, 1983). La phosphatase alcaline peut également être utilisée comme marqueur de différenciation dans cette lignée cellulaire (Bestwick et Milne, 2001).

Les cultures de cellules Caco-2 sont hétérogènes. L'expression des différentes protéines lors de la différenciation des cellules Caco-2 n'est pas contrôlée par un mécanisme général ce qui cause des délais dans l'apparition de différents marqueurs entre les cellules (Vachon *et al.*, 1996). En fait, il a été démontré que même l'expression de la sucrase-isomaltase est hétérogène en culture (Beaulieu et Quaroni, 1991). Il est donc nécessaire

d'attendre plusieurs jours après la confluence afin de laisser le temps aux cellules de se différencier et ainsi optimiser l'état de différenciation global de la monocouche.

Il est également important de noter qu'une lignée cellulaire doit pouvoir être maintenue en absence de sérum pour étudier la toxicité du Cd puisque le sérum peut lier le Cd dans le milieu de culture et en diminuer l'accumulation cellulaire. À ce propos, le choix de la lignée cellulaire Caco-2 est pertinent puisqu'il a été démontré qu'elle peut être maintenue sans sérum (Jumarie et Malo, 1991).

D'autres lignées cellulaires auraient pu être utilisées dans cette étude, mais comparativement à chacune d'elles, la lignée cellulaire Caco-2 offre des avantages. Par exemple, la lignée HT-29, qui est également dérivée d'un adénocarcinome humain, ne se différencie pas spontanément (le glucose doit être remplacé par le galactose comme source de carbone) et que très lentement puisqu'il faut environ cinquante jours pour observer la différenciation complète des cellules (Gout *et al.*, 2004). La lignée cellulaire HIEC est composée de cellules prolifératives de cryptes de l'épithélium intestinal humain. Malheureusement cette lignée ne se différencie pas et ne permet donc pas de comparer les deux types cellulaires (Gauthier *et al.*, 2001). La lignée cellulaire IEC-18 quant à elle pose le même problème que les cellules HIEC, en plus d'être une lignée murine et non une lignée humaine comme Caco-2 (Duizer *et al.*, 1999). La lignée int-407 pour sa part est une culture de cellules embryonnaires très peu utilisée (Jing et Kitts, 2004).

Finalement, il est à noter que les cellules Caco-2 ont été beaucoup plus utilisées lors d'études sur l'épithélium intestinal que d'autres lignées cellulaires comme HIEC ou IEC-18 et que de très nombreuses informations sont disponibles dans la littérature à leur sujet.

4.2 La lignée cellulaire Caco-2 et le cadmium

Peu d'études utilisent la lignée cellulaire Caco-2 afin d'évaluer la toxicité du Cd sur l'épithélium intestinal, cette lignée étant surtout utilisée afin d'étudier les mécanismes de transport et de différenciation entérocytaire. La cinétique du transport de Cd dans les cellules Caco-2 différenciées a déjà été étudiée et il est clair que le Cd s'accumule dans ces cellules selon un processus saturable (Mata *et al.*, 1996; Jumarie *et al.*, 1997). De plus, il est connu que le transport de Cd ne peut se faire que par une voie transcellulaire dans cette lignée

(Jumarie *et al.*, 1999). Une accumulation par la membrane basolatérale a aussi été observée, suggérant un rôle d'excrétion de l'épithélium intestinal, le Cd étant éliminé dans le fèces durant le renouvellement des entérocytes (Jumarie *et al.*, 1999).

Un avantage de la lignée cellulaire Caco-2 est qu'elle permet d'étudier la toxicité du Cd sur des cellules prolifératives et différenciées provenant de la même sous-culture. Pourtant, à notre connaissance aucune étude n'a effectué ce type d'analyse dans les cellules Caco-2. En effet, la majorité des études sur la toxicité du Cd ont été effectuées sur des cultures post-confluence différenciées afin d'évaluer l'impact du Cd sur les entérocytes de l'épithélium intestinal.

Au niveau des cellules Caco-2 différenciées, il est connu que le Cd modifie l'organisation structurale de la E-cadherine qui permet les liaisons intercellulaires, ainsi que d'autres protéines impliquées dans les jonctions serrées, ce qui cause une diminution de la résistance électrique transépithéliale des monocouches cellulaires et une augmentation de la perméabilité au mannitol. Une exposition à 100 μM Cd durant 4 heures ou à 20 μM durant 14 heures suffisent pour produire ces effets (Duizer *et al.*, 1999). La fonction des entérocytes peut donc être grandement affectée en présence de Cd puisque la polarité fonctionnelle est tributaire de la polarité morphologique. Il semblerait qu'une exposition de 6 h à des concentrations de Cd allant jusqu'à 5 μM soit non-toxique pour les cellules différenciées car aucune modification de la résistance électrique transépithéliale n'est alors observée et aucune fuite de lactate déshydrogénase, communément utilisée comme marqueur de dommage tissulaire, n'est mesurée (Blais *et al.*, 1999). Malgré tout, dans ces conditions le contenu cellulaire en MT augmente d'environ 12 fois (Blais *et al.*, 1999). L'induction de la synthèse de HSP70 a quant à elle été observée dans les cellules différenciées exposées à des concentrations de Cd d'au moins 10 μM (Boveri *et al.*, 2004). Des expériences menées à des concentrations plus élevées sur les cellules différenciées ont révélé qu'une concentration minimale de 25 μM est nécessaire pour observer une fuite de lactase déshydrogénase et que de la nécrose est observée à partir de 50 μM (Boveri *et al.*, 2004). Il est à noter que la mortalité cellulaire observée dans les cellules différenciées exposées à des concentrations de Cd variant entre 10 et 100 μM est toujours causée par nécrose et jamais par apoptose, la présence d'apoptose étant vérifiée à l'aide d'annexine V-Alexa Fluor 488 (Boveri *et al.*, 2004).

Moins d'information est disponible sur la toxicité du Cd dans les cellules Caco-2 en phase proliférative. Tout d'abord, aucune diminution significative de la viabilité cellulaire n'est observée dans les clones TC7 en phase proliférative, exposés à 10 μM de Cd (Huynh-Delorme *et al.*, 2005). Il est également démontré que les niveaux de MT dans ces cellules cessent d'augmenter à des concentrations de Cd excédant 20 μM (Mata *et al.*, 1996). Il est intéressant de noter qu'une réponse inflammatoire, confirmée par l'induction d'interleukine-8 qui est proinflammatoire, précède la fuite de lactate déshydrogénase dans les cellules prolifératives. Cette réponse pourrait empêcher l'entrée de pathogènes lors d'une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal par le Cd (Hyun *et al.*, 2007).

À notre connaissance, aucune étude n'a encore évalué une possible tolérance au Cd induite par le Zn dans les cellules Caco-2, malgré que les interactions entre ces deux métaux pour le transport membranaire dans ces cellules aient été étudiées. Cette tolérance a cependant été estimée dans plusieurs autres modèles cellulaires, dont certains humains, tel que mentionné précédemment. Pour ce qui est de la toxicité du Zn lui-même, une diminution de la viabilité cellulaire et de l'intégrité membranaire est observée à partir de 200 μM de Zn dans les cellules Caco-2, tant prolifératives que différenciées, pour une exposition de 24 h (Zödl *et al.*, 2003).

4.3 La lignée cellulaire Caco-2 et le stress oxydatif

Il a déjà été démontré que le Cd induit un stress oxydatif dans les cellules Caco-2 (Bolduc *et al.*, 2004). Des liens clairs peuvent d'ailleurs être faits entre les effets du Cd et les effets du stress oxydatif sur les cellules Caco-2. Tout d'abord, le stress oxydatif affecte lui aussi la résistance électrique transépithéliale des cellules Caco-2 différenciées (Baker *et al.*, 1995). Cet effet serait causé, entre autres, par le H_2O_2 qui est connu pour affecter la résistance électrique transépithéliale des cellules différenciées, cet effet pouvant cependant être inhibé par le facteur de croissance épidermique présent dans les sécrétions gastro-intestinales (Rao *et al.*, 1999). Dans d'autres modèles cellulaires, il a été démontré que le Cd peut inhiber de façon dose-dépendante la synthèse d'ADN induite par le facteur de croissance épidermique (Kang et Enger, 1991). Il est bon de rappeler ici qu'il se produit une accumulation de H_2O_2 en présence de Cd. Le H_2O_2 est d'ailleurs considéré par certains comme l'espèce réactive de

l'oxygène principale impliquée dans la toxicité du Cd (Yang *et al.*, 1997). Il est donc probable que la perte de fonction des cellules Caco-2 différenciées en présence de Cd soit explicable par la production de H_2O_2 .

Plusieurs autres informations pertinentes sont disponibles à propos du stress oxydatif dans les cellules Caco-2. Un stress oxydant peut inhiber la prolifération des cellules et il est connu que cette inhibition est accrue si le ratio GSH/GSSG diminue (Noda *et al.*, 2001). Il est bon de se rappeler que le Cd est connu comme oxydant le GSH. Par ailleurs, les cellules Caco-2 n'ont pas toutes une défense équivalente contre le stress oxydatif. En effet, l'activité de certaines enzymes antioxydantes, notamment la CAT et la glutathion réductase, augmente après la confluence (Bestwick et Milne, 2001). De plus, le rôle important de la MT dans la protection contre le stress oxydatif a été confirmé dans une autre étude qui suggère que la MT aurait même une activité antioxydante plus importante que la CAT ou la SOD dans les cellules différenciées (Kameoka *et al.*, 1999). Aussi, les cellules différenciées semblent plus résistantes au stress oxydatif lorsque appliqué sur le côté apical que sur leur côté basal; l'intégrité de la barrière paracellulaire est alors mieux conservée (Baker *et al.*, 1995).

CHAPITRE V

ARTICLE

Role of reactive oxygen species in cadmium-induced adaptation mechanisms in proliferative Caco-2 cells.

Cardin Guillaume B, Jumarie Catherine*.

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal,
C.P. 8888 Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8

* To whom correspondence should be addressed

jumarie.catherine@uqam.ca

5.1 Abstract

Cadmium (Cd) is a highly toxic metal which enters the food chain. Following oral ingestion, the intestinal epithelium is the first biological barrier crossed by Cd and therefore has mostly been studied in relation to transport mechanisms. In the present study, the Caco-2 cell line was used to evaluate the impact of an exposure to low levels of Cd on both proliferative and differentiated cells. As revealed by LC50 values estimated with 3-[4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, mature Caco-2 cells were more resistant to Cd but proliferative cells were able to develop a tolerance following a 24-h exposure to non cytotoxic levels (10 μ M) of Cd. RT-PCR analysis and cellular thiol content assay suggest higher levels of MT-IIa and HSP70 as well as higher cellular contents of glutathione (GSH) in proliferative cells exposed to 10 μ M of Cd. However, results obtained with cycloheximide used to inhibit protein synthesis and with L-buthionine sulfoximine (BSO) which inhibits GSH synthesis revealed that induction of these stress proteins is not entirely responsible for the observed acquired tolerance. On the other hand, the presence of 100 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3AT), a catalase inhibitor, prevented the induction of tolerance and sensitized proliferative cells to Cd acute toxicity. Cells pre-exposed to Zinc (Zn) were also more resistant to a subsequent exposure to Cd. For these cells, 3AT did not prevent the acquired tolerance. These results show for the first time that proliferative but not differentiated intestinal cells may develop tolerance to Cd. They also show that pro-oxidant conditions in the absence of active catalase may inhibit the induction of tolerance. This would be critical for Cd- but not Zn-induced mechanisms of resistance as Cd but not Zn may induce oxidative stress.

Keywords: Cadmium, oxidative stress, intestinal epithelium, Caco-2 cells, resistance.

Abbreviations: 3AT, 3-amino-1,2,4-triazole; BCNU, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea; BSO, L-buthionine sulfoximine; CAT, catalase; CHX, cycloheximide; DMEM, Dulbecco's modified eagle essential minimum medium; FBS, Fetal Bovine Serum; GSH, reduced glutathione; GSH-Px, glutathione peroxidase; GSSG, oxidized glutathione; LC50, lethal concentration 50; MTT, 3-[4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

5.2 Introduction

Cadmium (Cd) is a widespread highly toxic metal which accumulates mostly in kidney and liver, while kidney is the main target organ (Friberg, 1984; Nordberg, 1984; Lauwerys *et al.*, 1994). It is released during the burning of fossil fuels and is found in cigarette smoke as well as in some batteries, paints and plastics (Watkin *et al.*, 2003). Its biological half-life in humans has been estimated to range from 15 to 20 years (Jacobs and Wood, 2004). Cadmium is classified as a type I carcinogen by the International Agency for Cancer Research (IARC, 1993).

Cadmium is also known to favour reactive oxygen species production leading to oxidative stress (Wang *et al.*, 2004), as well as to induce stress proteins like MT-IIa and HSP70 (Kiang and Tsokos, 1998; Blais *et al.*, 1999). The formation of reactive oxygen species is thought to be mediated by superoxide production in the mitochondria following Cd-induced inhibition of the electron transfer chain (Wang *et al.*, 2004). Other mechanisms have been suggested to explain Cd-mediated oxidative stress including binding to sulfhydryl groups of specific proteins and the release of iron, which catalyses the Fenton reaction, from its binding sites (Casalino *et al.*, 1997; Souza *et al.*, 2004).

Food is the main exposure source of Cd for non-smoking humans, because Cd enters the food chain following absorption by plants and vegetables from soils contaminated via atmospheric depositions and phosphate fertilizers (WHO, 1992). The intestinal epithelium is the first protective barrier against Cd toxicity following oral exposure and is therefore of great importance. This epithelium has a fast renewing rate supported by rapidly proliferating stem cells located in the intestinal crypts that give rise to four different cell types: the absorptive cells called enterocytes, the goblet cells, the enteroendocrine cells and the Paneth cells (Snoeck *et al.*, 2005). Damage to the intestinal epithelium integrity, including increased paracellular permeability and altered cell viability, have been reported following exposure to Cd (Duizer *et al.*, 1999; Boveri *et al.*, 2004). These effects can impair the intestinal epithelium's protective role against adverse agents as well as nutrient absorption. Therefore, studies aiming to increase our knowledge about toxic effects of Cd on the intestinal epithelium are of primary interest.

We have studied Cd toxicity in the Caco-2 cell line used as an *in vitro* model for intestinal cells. These cells are unique since they undergo spontaneous enterocytic differentiation once confluency is reached in culture dishes. They form a polarized monolayer with tight junctions and express numerous morphological and biochemical features of mature absorptive cells (Pinto *et al.*, 1983; Meunier *et al.*, 1995). This cell line can therefore be used to study both proliferative and differentiated cells. The objective of this study was to evaluate the extent to which intestinal cells may adapt to low levels of Cd. Our results reveal that a 24-h pre-exposure to 10 μ M Cd induces resistance to a subsequent exposure to Cd in proliferative but not differentiated Caco-2 cells. We have tested the hypothesis that oxidative stress is involved in Cd-induced resistance by measuring intracellular glutathione (GSH) levels as well as MT-IIa and HSP70 expression. Differences between Cd- and zinc (Zn)-induced mechanisms of resistance were also investigated. To our knowledge, this is the first study to consider the impact of intestinal differentiation status on cellular response to Cd toxicity.

5.3 Materials and methods

5.3.1 Cell culture

Caco-2 cells were graciously supplied by Dr. A. Zweibaum (INSERM U178, Villejuif, France) and were used between passages 201 and 215. The cells were maintained at 37°C in a 5 % CO₂ humidified atmosphere in Dulbecco's modified eagle minimum essential medium (DMEM) (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 15 % inactivated fetal bovine serum (FBS) (Medicorp Inc., Montreal, QC, Canada), 0.1 mM non-essential amino acids, 19 mM NaHCO₃, and 50 000 U/L-50 mg/L penicillin-streptomycin (GibcoBRL), pH 7.1 adjusted with HCl. Stock cultures were seeded in 75 cm² flasks (Corning Inc., Corning, NY, USA) at 2.6×10^4 cells/cm², while experiments were conducted using cells seeded at a density of 1.3×10^4 cells/cm², cultured in 10-cm and 3-cm diameter Petri dishes (Corning Inc.) and 96-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). The culture medium was replaced every 2 days and cells were maintained for 7 and 21 days to study proliferative and differentiated cells, respectively.

5.3.2 Preparation of cadmium and zinc stock solutions

Cadmium and zinc chloride were dissolved in ultrapure water. Stock solutions were sterilized using a 0.22 µm filter. The solutions were diluted (1:100 to 1:1000) in FBS-free DMEM medium.

5.3.3 Cell viability measurement

The MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA) assay is a colorimetric test in which the mitochondrial dehydrogenase of viable cells reduces MTT to a blue formazan product (Carmichael *et al.*, 1987), and is used as a cell viability assay as previously performed, with minor modifications (Pham *et al.*, 2006). Cells grown for 6 or 20 days on 96-well plates were rinsed twice with FBS-free DMEM prior to incubation for 24 h (referred to as pretreatment) in the absence or presence of 10 µM Cd, 20 µM Cd, or 100 µM Zn with or without: 1 µM cycloheximide (CHX) (Sigma), 3 mM L-buthionine sulfoximine (BSO) (Sigma), 30 µM 1,3-bis(2-

chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) (Sigma) with 30 μ M diamide (Sigma), or 100 mM 3-amino-1,2,4-triazole (3AT) (Sigma). CHX is a protein synthesis inhibitor; BSO, BCNU and 3AT inhibit γ -glutamyl cysteine synthetase, glutathione reductase and catalase (CAT), respectively, whereas diamide oxidizes thiols as GSH. The concentrations of inhibitors were chosen for their optimal effect as revealed by dose-response curves (data not shown). After pretreatment, cells were incubated in FBS-free medium containing increasing concentrations (0 - 500 μ M) of Cd or Zn during another subsequent 24 h (referred to as treatment). Then, 10 μ M MTT (5mg/ml) was added to each well. Cells were incubated for 3 h and the medium was changed for DMSO to dissolve formazan and optical density was measured at 575 nm using a microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA USA). For kinetic studies of induction of resistance, duration of cellular pretreatment with 10 μ M Cd was 6, 12, 24 and 48 h, whereas all treatments started at the same time, on 7-day-old cell cultures, with four replicates per treatment.

5.3.4 Uptake measurement of ^{109}Cd

Six-day-old and 20-day-old cells grown on 3-cm diameter culture dishes were maintained for 24 h in FBS-free DMEM in the absence or presence of 10 μ M Cd and then were exposed for 24 h to 0.5 μ M ^{109}Cd . Then, cells were rinsed four times with 2 ml of ice-cold stop solution as described by Bergeron and Jumarie (2006). Cells were dissolved in 1N NaOH (500 μ l) and radioactivity was estimated using a Cobra II gamma counter (Canberra Packard, Concord, ON Canada). Total cellular protein was estimated according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as the calibration standard and levels of Cd accumulation are expressed as pmol per mg of protein.

5.3.5 RT-PCR analysis

Cells were cultured in 10-cm Petri dishes for 6 or 20 days. Cells were then rinsed twice with FBS-free DMEM and incubated for 24 h in the absence or presence of 10 μ M Cd. Total RNA was extracted using Trizol[®] Reagent (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada) according to the supplier's instructions. The mRNA pellets were dissolved in 50 μ l of water that was treated with 0.1 % diethylpyrocarbonate and autoclaved. The mRNA's

purity and concentration were assessed as described by Bergeron and Jumarie (2006). Reverse transcription was performed using 2 µg of mRNA in a 20 µl total volume, 1 µM random hexamere pd(N)6 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire UK) and the Omniscript® RT Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the supplier's instructions. PCR was conducted with the Taq PCR Core Kit (Qiagen). The sense and antisense primer sequences for β -actin were 5'-aagatgaccaggtgagtgg and 5'-cagaggcgtacaggatagc (GenBank M10277, bases 1576-1901), 5'-ggatcccaactgctcctg and 5'-cagcagctgcacttgcc for MT-IIa (GenBank BT007315, bases 3-179) and 5'-ggcatcgacctgggcaccac and 5'-tccttggtggcctggcgctg for HSP70 (GenBank NM005345, bases 219-676). For β -actin and MT-IIa, 40 cycles were used consisting of: denaturation at 94°C for 60 sec, annealing at 58°C for 30 sec and extension at 72°C for 60 sec. For HSP70, 30 cycles were used consisting of: denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 62°C for 30 sec and extension at 72°C for 60 sec. The resulting PCR products were separated on 2 % (w/v) agarose gel with ethidium bromide and visualized under UV trans-illumination using a LKB 2011 Macrovue Fluorescence system controlled by Alphasager™ 2200 software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA). MT-IIa and HSP70 mRNAs levels both were normalized to that of β -actin.

5.3.6 Enzymatic activity assays

Catalase and glutathione peroxidase (GPX) activities were estimated in 7-day-old proliferative cells according to the methods used by Dorval and Hontela (2003). Catalase activity can be directly measured by the decrease in sample's absorbance at 240 nm ($\epsilon = 0.04/\text{mM}/\text{cm}$) resulting from hydrogen peroxide decomposition, and GPX activity can be estimated by the decrease in absorbance at 340 nm ($\epsilon = 6.22/\text{mM}/\text{cm}$) caused by NADPH oxidation. CAT activity was estimated in cells pre-exposed for 24 h (on day 6) to 0, 1, 5, 10, 15 or 20 µM Cd in FBS-free DMEM. Measurements were conducted in 2.85 ml of PBS buffer containing 13.4 mM hydrogen peroxide and 150 µl of the total 1 ml cellular lysate. Glutathione peroxidase activity was estimated in cells pre-exposed for 24 h (on day 6) to 0 or 10 µM Cd in FBS-free DMEM. Absorbance was measured using a Beckman DU® 650 spectrophotometer (Beckman Coulter, Mississauga, ON Canada) and enzyme activities are

expressed as mU per mg of total cellular protein (one Unit hydrolyzed one μmol of substrate per minute).

5.3.7 Thiol content measurements

Cellular thiol contents were determined according to the method of Anderson (1985). Six-day-old and 20-day-old cells were rinsed twice with FBS-free DMEM and then kept in that medium for 24 h in the absence or presence of 10 μM Cd. Thiol contents are expressed relative to that of protein.

5.3.8 Cytometer analysis

Six-day-old cells grown in 3-cm diameter culture dishes were maintained for 24 h in FBS-free DMEM with Cd concentrations ranging from 0 to 100 μM , rinsed twice with PBS, then resuspended at 10^6 cells/mL in PBS and fixed with 75 % ethanol during 1 hour. Cells were then rinsed twice with PBS and stained with 1 ml of propidium iodide (Sigma) (50 $\mu\text{g/mL}$ with 3.8 mM sodium citrate in PBS) with 50 μL of RNaseA (Worthington Biochemicals, Lake Wood, NJ, USA) (10 $\mu\text{g/mL}$) that had been previously boiled for 5 min. Following a 3h incubation at 4°C, the DNA content was analysed using a FACScan™ flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) with fluorescence (FL-2A) set at 585 nm and 4000 events for each replicate. Data were analysed using the Modfit LT software (Verity Software House, Inc., Topsham, ME, USA).

5.3.9 Statistics

Unless otherwise specified, results are mean \pm SD estimated on 3 independent cell cultures, each in triplicate. Cellular viability as a function of increasing concentrations of Cd was analyzed according to the following dose-response equation:

$$y = y_{\min} + \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + 10^{(\log LC_{50} - x) \cdot \text{Hill slope}}}$$

where y_{\max} and y_{\min} are the maximal and minimal ratio of cell viability, respectively, and LC_{50} is the concentration of Cd for which a cell viability ratio of 0.5 is observed.

Statistical analyses for thiol contents and LC50 were performed by one-way ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparison tests. Stress protein levels were compared using the unpaired Student's *t*-test. Nonlinear regression and statistical analysis were performed using Prism 4 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical significance was assessed at $p \leq 0.05$. The errors associated with the parameter values given in the text represent the standard error of regression of the LC50 values.

5.4 Results

5.4.1 Effect of a pre-exposure to Cd on cellular sensitivity to Cd

Cell viability was estimated by MTT measurements to evaluate the effect of a 24-h pre-exposure to Cd on cellular sensitivity to a subsequent exposure to Cd. As shown in Fig. 5.1, a 2-fold increase was obtained in the LC50 values of proliferative but not differentiated cells pre-exposed to 10 μ M Cd. Increasing Cd concentration to 20 μ M did not significantly enhanced the acquired tolerance to Cd thus 10 μ M was chosen for the subsequent experiments especially that the higher level of exposure decreased cell viability. Increasing Cd pre-exposure up to 100 μ M did not induced tolerance in differentiated cells (data not shown). Flow cytometry analysis revealed that cellular death occurred by necrosis without any Cd-induced apoptosis (data not shown). Note that LC50 was 2-fold higher in control untreated differentiated cells compared to proliferative cells (fig 5.1). However, following pre-exposure to 10 μ M Cd, proliferative cells developed a similar level of resistance to Cd as differentiated cells (LC50 = 123 ± 5 vs. 117 ± 29 μ M for 7-day-old and 21-day-old cells, respectively). Kinetic studies revealed that optimal induction of tolerance with 10 μ M Cd in proliferative cells occurs between 12 and 24 h (Fig. 5.2). Therefore 24 h was chosen for pretreatment of cells in subsequent experiments. Although not statistically significant, metal accumulation was 50 % higher in proliferative cells compared to differentiated cells, following a 24-h exposure to 0.5 μ M ^{109}Cd (Fig. 5.3). In both cell cultures, pre-exposure to 10 μ M Cd did not modify ^{109}Cd accumulation. Thus, there is clearly no correlation between induction of tolerance to Cd (i.e. differences in LC50 values) and level of cellular metal accumulation. On the other hand, the higher basal resistance to Cd of differentiated cells could be partially explained by their lower Cd accumulation.

5.4.2 MT-Ila and HSP70 expression in cells pre-exposed to Cd

In order to estimate to what extent MT and/or HSP synthesis may be responsible for the acquired tolerance to Cd in proliferative cells, MT and HSP expressions were studied by RT-PCR (Fig. 5.4a). Densitometry analysis of RT-PCR products shows that a pre-exposure to 10 μ M Cd increased MT-Ila and HSP70 mRNA levels both in proliferative and differentiated

cells. Even though not significantly different compared to differentiated cells, the increases in mRNA levels of both proteins were higher in proliferative cells (Fig. 5.4b). Control HSP70 mRNA levels were smaller in differentiated cells (Data not shown). Also, CHX, known to inhibit protein synthesis, was used to evaluate the role of newly synthesized proteins in Cd-induced resistance. Pre-exposure to 1 μ M CHX significantly sensitized proliferative cells to Cd acute toxicity ($LC_{50} = 49.4 \pm 5.1 \mu$ M vs. 26.8 ± 3.4 for control and CHX-pretreated cells, respectively), but didn't prevent the acquired resistance following a pre-exposure to 10 μ M Cd ($LC_{50} = 26.8 \pm 3.4$ vs. $63.2 \pm 4.2 \mu$ M for cells pre-exposed to CHX and to CHX + Cd, respectively) (Fig. 5.5). Also, in both control and CHX-pretreated cells, pre-exposure to 10 μ M Cd led to a similar 2-fold increase in the LC_{50} value estimated for a subsequent exposure to Cd.

5.4.3 Cellular glutathione and thiol contents following pre-exposure to Cd

The role of intracellular thiols and GSH in the acquired resistance to Cd was also investigated. Measurements of intracellular reduced thiols revealed that they were significantly higher by 95 % in control differentiated cells compared to control proliferative cells (Fig. 5.6). Interestingly, a significant 65 % increase in reduced thiol contents was induced in proliferative cells following a 24-h exposure to 10 μ M Cd, whereas no change occurred in differentiated cells. Cell viability was then tested in the presence of a GSH synthesis inhibitor. Pre-exposure to 3 mM BSO significantly sensitized cells to Cd acute toxicity ($LC_{50} = 48.5 \pm 5.2$ vs. $14.8 \pm 1.6 \mu$ M for control and BSO-pretreated cells, respectively) but didn't prevent the induction of resistance during pre-exposure to 10 μ M Cd ($LC_{50} = 14.8 \pm 1.6$ vs. $24.9 \pm 1.6 \mu$ M for cells pre-exposed to BSO and to BSO + Cd, respectively) (Fig. 5.7). In this case, increases in LC_{50} values (1.6 to 1.9-fold) were similar in control and BSO-pretreated cells. The oxidation of GSH in addition to the inhibition of glutathione reductase in the presence of 30 μ M BCNU and 30 μ M diamide had no significant effect on cellular sensitivity to Cd or the acquired tolerance (Fig. 5.8).

5.4.4 Catalase and glutathione peroxidase activities

To get further insights into the possible involvement of oxidative stress in Cd-induced mechanisms of acquired tolerance, antioxidant enzyme activities were estimated as well as cellular viability following CAT inhibition. A 24-h exposure to increasing concentrations of Cd led to a small but significant inhibition of CAT activity in proliferative cells with 22 % inhibition at 20 μM Cd (Fig. 5.9). Catalase activity (5568 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ protein) was about 150 times higher compared to GPx activity (37 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ protein) in control proliferative cells (Fig. 5.10). The 94 % inhibition of CAT in the presence of 100 mM 3AT (data not shown) did not modify cellular sensitivity to acute Cd toxicity, but prevented the induction of tolerance to Cd and clearly sensitized cells pre-exposed to both 3AT and 10 μM Cd (Fig. 5.11).

5.4.5 Effect of a pre-exposure to Zn on cellular sensitivity to Cd

Pre-exposure of cells to Zn was tested for its putative effect on cellular sensitivity to a subsequent exposure to Cd. A concentration of 100 μM was chosen for its similar effect on cell viability compared to 10 μM Cd, as revealed by dose-response studies (data not shown). Indeed, a 24-h exposure to either 10 μM Cd or 100 μM Zn led to a less than 5 % decrease in cell viability. Pre-exposure of cells to 100 μM Zn increased cellular tolerance to Cd to a similar extent when compared to 10 μM Cd. (Fig. 5.12). As was observed with Cd, Zn-induced tolerance to Cd also occurred in the presence of 1 μM CHX (Fig. 5.13), or 3 mM BSO (Fig. 5.14). However, contrary to Cd, pre-exposure to both 3 mM BSO and 100 μM Zn increased tolerance to Cd (Fig. 5.14) and pre-exposure to both 100 mM 3AT and 100 μM Zn did not sensitize cells to Cd and the increased tolerance to Cd still occurred (Fig. 5.15).

5.5 Discussion

5.5.1 Induction of resistance to Cd varies with the differentiation status

The results of this study show that a pre-exposure to 10 μ M Cd induces a resistance to Cd in proliferative but not differentiated Caco-2 cells, even though the latter are more resistant to Cd (Fig. 5.1). This may be related to the fact that differentiated Caco-2 cells express higher levels of antioxidant enzyme activities, notably for CAT, GPx and glutathione reductase (Baker and Baker, 1995). Now, why additional tolerance to Cd cannot be induced in differentiated cells which are already more resistant? Two hypotheses may be suggested: i) mechanisms of acquired resistance are lost during differentiation or; ii) tolerance by itself involves saturable mechanisms still maximally expressed in control differentiated cells. Although LC50 values obtained for proliferative cells pre-exposed to 10 μ M Cd were slightly higher than for control differentiated cells, this difference was not significant, thus discrimination between the two hypotheses needs further investigation. Nonetheless, differences in sensitivity to Cd between proliferative and differentiated cells, as well as acquired resistance to Cd, are not related to modification in the levels of cellular accumulation of Cd (Fig. 5.3).

5.5.2 Expression of stress proteins is not responsible for the acquired resistance

The level of MT expression was correlated with intracellular Cd content in Caco-2 cells (Blais *et al.*, 1999), and MT-IIa has been shown to protect against Cd toxicity and oxidative stress (Hawse *et al.*, 2006). Similarly, HSP70 expression is induced in the presence of Cd or under oxidative stress conditions (Kiang and Tsokos, 1998). This HSP protects against oxidative stress caused by hydrogen peroxide (Spitz *et al.*, 1987). The higher induction of both MT-IIa and HSP70 mRNA observed in proliferative Caco-2 cells compared to differentiated cells (Fig. 5.4) may be explained by a higher cellular sensitivity to oxidative stress because of the lower level of antioxidant enzyme activities (Baker and Baker, 1995). Gene expression of both MT-IIa and HSP70 has been shown to be induced within the first hours following exposure to Cd, with maximal expression being reached as soon as six hours in various human cells (Murata *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2004). Here we show that increases

in LC50 values occur between 12 and 24 h following exposure to 10 μ M Cd, suggesting that MT-IIa and HSP70 are not entirely responsible for the acquired resistance to Cd (Fig. 5.2). This conclusion is further supported by the fact that significant increases in both stress protein mRNAs were also observed for differentiated cells although they did not show increased resistance to Cd. In accordance with these observations, studies have shown that cells maintain resistance to Cd during seven passages or 15 days following the end of exposure to Cd although cellular MT levels return back to control values after this period of time (Croute *et al.*, 2000; Lau *et al.*, 2006). Furthermore, a pre-exposure with 1 μ M CHX, an inhibitor of protein synthesis, sensitized proliferative cells to Cd, but didn't prevent the induction of resistance as revealed by the similar LC50 ratios obtained following pre-exposure to CHX or to a mixture of CHX and 10 μ M Cd (Fig. 5.5). This suggests that even though MTs and HSPs protect the cells against acute Cd toxicity, they are seemingly not the main factors responsible for the observed acquired resistance.

5.5.3 Oxidative stress impairs the induction of resistance to Cd

Low concentrations of Cd, leading to the production of low levels of free radicals, have been shown to increase intracellular content of GSH, whereas higher Cd concentrations may decrease it (Almazan *et al.*, 2000; Elbekai and El-Kadi, 2005). An increase in reduced thiol-containing proteins, presumably MTs and GSH, was observed in proliferative but not differentiated Caco-2 cells following a 24-h pre-exposure to 10 μ M Cd (Fig. 5.6), supporting the hypothesis that 10 μ M Cd induces a mild oxidative stress in proliferative cells, but probably not in differentiated cells. The possible importance of newly synthesized GSH was studied using BSO, an inhibitor of γ -glutamyl cysteine synthetase which catalyses the rate-limiting step during GSH synthesis. Pre-exposure to 3 mM BSO did not prevent the induction of a resistance to Cd in proliferative cells, the ratio of increased LC50 values following pretreatment with 10 μ M Cd being the same despite the presence or the absence of BSO (Fig. 5.7). On the other hand, BSO sensitized proliferative cells to acute Cd toxicity, as did CHX. Even though GSH protects against Cd toxicity, increased tolerance to Cd would not necessarily require GSH synthesis. Actually, increased intracellular levels of GSH may be a marker of Cd-induced oxidative stress. The role of GSH was then further investigated using diamide and BCNU, which oxidise GSH and inhibit glutathione reductase, respectively. Pre-

exposure to both 30 μ M diamide and BCNU has been shown to markedly decrease the intracellular GSH:GSSG ratio, even though it was not as efficient as BSO in lowering intracellular GSH levels in Caco-2 cells (Noda *et al.*, 2001). Pre-exposure to diamide and BCNU had no effect on the induction of resistance to Cd and on the acute Cd toxicity in proliferative cells (Fig. 5.8). Similar results were obtained with higher diamide and BCNU concentrations (data not shown). These results show the importance of newly synthesized GSH in protection against acute Cd toxicity, even though synthesis of GSH is not a prerequisite to the acquired resistance to Cd.

A 24-h exposure to 10 μ M Cd led to a small 9 % decrease in CAT activity (Fig. 5.9). Catalase activity was found to be about 150 times higher compared to GPx thus CAT appears to be the main enzyme responsible for hydrogen peroxide detoxification in proliferative Caco-2 cells (Fig. 5.10). It seems unlikely that a 9 % decrease in CAT activity would generate an oxidative stress, but the involvement of higher levels of hydrogen peroxide in the induction of resistance cannot be ruled out. Indeed, it was shown that hydrogen peroxide accumulates in cells exposed to Cd (Schützendübel *et al.*, 2001), and it has been suggested that hydrogen peroxide is the main ROS involved in Cd toxicity (Yang *et al.*, 1997). The impact of CAT inhibition, the main hydrogen peroxide detoxifying enzyme, has been studied using 3AT. Pre-exposure to 100 mM 3AT did not sensitize proliferative cells to acute Cd toxicity, but co-exposure with 10 μ M Cd completely prevented the induction of resistance to Cd and sensitized cells to a subsequent exposure to Cd (Fig. 5.11). The exact mechanism responsible for this sensitization remains to be clarified. However, our results clearly suggest that cellular redox status is critical for the induction of resistance, and high oxidative stress resulting from inhibition of CAT would impair the ability of cells to develop tolerance.

A 24-h pre-exposure to 100 μ M Zn induced cellular resistance similar to 10 μ M Cd (Fig. 5.12), and the acquired tolerance to a subsequent exposure to Cd still occurred in the presence of 1 μ M CHX (Fig. 5.13), or 3 mM BSO (Fig. 5.14), as was observed for Cd-induced resistance. However, unlike cells that were co-treated with 10 μ M Cd and 100 mM 3AT, the combination of 100 μ M Zn and 100 mM 3AT did not impair the induction of resistance (Fig. 5.15). These results reveal different mechanisms for Cd- and Zn-induced tolerance or, at least, different cellular capability to acquire tolerance. The fact that Cd but not

Zn may lead to oxidative stress is likely responsible for the difference observed in cellular response to Cd- vs. Zn-induced tolerance. Both metals may rapidly induce MT-IIa and HSP70 expression (Murata *et al.*, 1999), but our results suggest that other mechanisms of tolerance are involved which require further investigation.

5.5.4 Conclusion

In summary, our results demonstrate the importance of stress proteins and GSH in acute intestinal toxicity of Cd, but suggest that these proteins are not entirely responsible for the induction of resistance to Cd in proliferative Caco-2 cells. Active CAT, on the other hand, seems necessary as inhibition of CAT prevented the induction of tolerance. In addition CAT inhibition sensitized the cells to Cd toxicity. Catalase inhibition did not prevent induced resistance in cells pre-exposed to Zn, suggesting that oxidative stress may be critical for Cd- but not Zn-induced mechanisms of tolerance. For the first time, we also show that differentiated Caco-2 cells are more resistant to Cd compared to proliferative cells, but do not develop tolerance as occurs in proliferative cells. Considering the rapid renewal of the intestinal epithelium, adaptation of proliferative cells is critical and may protect against Cd toxicity. However, the impact of lack of acquired tolerance in differentiated cells clearly deserves to be further investigated.

5.5.5 Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

5.6 References

- Almazan G, Liu HN, Khorchid A, Sundararajan S, Martinez-Bermudez AK, Chemtob S. 2000. Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. *Free Radic Biol Med.* 29: 858-869.
- Anderson ME. 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113: 548-555.
- Baker SS, Baker RD. 1992. Antioxidant enzymes in the differentiated Caco-2 cell line. *In Vitro Cell Dev Biol.* 28A: 643-647.
- Bergeron PM, Jumarie C. 2006. Characterization of cadmium uptake in human intestinal crypt cells HIEC in relation to inorganic metal speciation. *Toxicology.* 219: 156-166.
- Blais A, Lecoœur S, Milhaud G, Tomé D, Kolf-Clauw, M. 1999. Cadmium uptake and transepithelial transport in control and long-term exposed Caco-2 cells: the role of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol.* 160: 76-85.
- Boveri M, Pazos P, Gennari A, Casado J, Hartung T, Prieto P. 2004. Comparison of the sensitivity of different toxicological endpoints in Caco-2 cells after cadmium chloride treatment. *Arch Toxicol.* 78: 201-206.
- Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942.
- Casalino E, Sblano C, Landriscina C. 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 346: 171-179.
- Croute F, Beau B, Arrabit C, Gaubin Y, Delmas F, Murat JC, Soleilhavoup JP. 2000. Pattern of stress protein expression in human lung cell-line A549 after short- or long-term exposure to cadmium. *Environ Health Perspect.* 108: 55-60.
- Dorval J, Hontela A. 2003. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol Appl Pharmacol.* 192: 191-200.

- Duizer E, Gilde AJ, Versantvoort CH, Groten JP. 1999. Effects of cadmium chloride on the paracellular barrier function of intestinal epithelial cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 155: 117-126.
- Elbekai RH, El-Kadi AO. 2005. The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As^{3+} , Cd^{2+} , and Cr^{6+} . *Free Radic Biol Med.* 39: 1499-1511.
- Friberg L. 1984. Cadmium and the kidney. *Environ Health Perspect.* 54: 1-11.
- Hawse JR, Padgaonkar VA, Leverenz VR, Pelliccia SE, Kantorow M, Giblin FJ. 2006. The role of metallothionein IIa in defending lens epithelial cells against cadmium and TBHP induced oxidative stress. *Mol Vis.* 12: 342-349.
- IARC. 1993. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. *IARC Sci Pub.* 58: 119-238.
- Jacobs P, Wood L. 2004. Macronutrients cadmium. *Disease-a-month.* 50: 46-50.
- Kiang JG, Tsokos GC. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther.* 80: 183-201.
- Lau AT, Zhang J, Chiu JF. 2006. Acquired tolerance in cadmium-adapted lung epithelial cells: roles of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway and basal level of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol.* 215: 1-8.
- Lauwerys RR, Bernard AM, Roels HA, Buchet JP. 1994. Cadmium: exposure markers as predictors of nephrotoxic effects. *Clin Chem.* 40: 1391-1394.
- Meunier V, Bourrié M, Berger Y, Fabre G. 1995. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol.* 11: 187-194.
- Murata M, Gong P, Suzuki K, Koizumi S. 1999. Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. *J Cell Physiol.* 180: 105-113.
- Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Aw TY. 2001. Induction of mild intracellular redox imbalance inhibits proliferation of Caco-2 cells. *FASEB J.* 15: 2131-2139.
- Nordberg M. 1984. General aspects of cadmium: transport, uptake and metabolism by the kidney. *Environ Health Perspect.* 54: 13-20.
- Pham TN, Marion M, Denizau F, Jumarie C. 2006. Cadmium-induced apoptosis in rat hepatocytes does not necessarily involve caspase-dependant pathways. *Toxicol In Vitro.* 20: 1331-1342.

- Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assman P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. 1983. Enterocytic-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell*. 47: 323-330.
- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative stress systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol*. 127: 887-898.
- Snoeck V, Goddeeris B, Cox E. 2005. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect*. 7: 997-1004.
- Souza V, Escobar MDC, Gómez-Quiroz L, Bucio L, Hernández E, Cossio EC, Gutiérrez-Ruiz MC. 2004. Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology*. 197: 213-228.
- Spitz DR, Dewey WC, Li GC. 1987. Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblasts. *J Cell Physiol*. 131: 364-373.
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 36: 1434-1443.
- Watkin RD, Nawrot T, Potts RJ, Hart BA. 2003. Mechanisms regulating the cadmium-mediated suppression of Sp1 transcription factor activity in alveolar epithelial cells. *Toxicology*. 184: 157-178.
- WHO. 1992. WHO, Cadmium. World Health Organization, Environmental Health Criteria No. 134. Geneva, Switzerland.
- Yang CF, Shen HM, Shen Y, Zhuang ZX, Ong CN. 1997. Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells). *Environ Health Perspect*. 105: 712-716.

5.7 Legends to figures

Figure 5.1 Effect of a pre-exposure to 10 or 20 μM Cd on MTT activity used as viability assay for a) proliferative 7-day-old cells, b) differentiated 21-day-old cells, c) LC50 values as a function of increasing pre-exposure concentrations of Cd. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 or 20 days, and were then pre-exposed to 10 or 20 μM Cd for 24 h before a subsequent 24-h exposure to increasing concentrations of Cd. Both pre-exposure and exposure were performed in the absence of FBS. Data shown are means \pm SD estimated on 2 independent cell cultures. Comparison tests were ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 5.2 Effect of time of pre-incubation with 10 μM Cd on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days and were then incubated with 10 μM Cd for 6, 12, 24 or 48 h before a subsequent 24-h exposure to increasing concentrations of Cd. Both pre-incubation and exposure were performed in the absence of FBS. Data shown are mean \pm SD estimated on 4 to 5 replicates of the same cell culture. Comparison tests were ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 5.3 Effect of a pre-exposure to 10 μM Cd on ^{109}Cd uptake in proliferative cells. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days, and were then exposed to 10 μM Cd before incubation with 0.5 μM ^{109}Cd . Both exposure and uptake were 24 h in the absence of FBS. Data are means \pm SD of 3 independent experiments. Comparison test is Student's *t*-test.

Figure 5.4 Effect of a pre-exposure to 10 μM Cd on MT-Ila and HSP70 mRNAs levels in proliferative and differentiated cells, as measured with RT-PCR, showing a) qualitative results on 2 % agarose gel and b) densitometry analyses of mRNA induction. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 and 20 days and were then exposed for 24 h to 10 μM Cd in the absence of FBS. Data shown are means \pm SD of 3 independent experiments. Comparison test is Student's *t*-test.

Figure 5.5 Effect of pretreatment with 1 μM CHX and 10 μM Cd on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days and were then pretreated with various experimental conditions before exposure to increasing concentrations of Cd. Both pretreatment and exposure were 24 h in the absence of FBS. Data are means \pm SD estimated on 3 independent cell cultures. Comparison tests were ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 5.6 Effect of exposure to 10 μM Cd on intracellular reduced thiol content in proliferative and differentiated cells. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 and 20 days and were then exposed to 10 μM Cd in the absence of FBS for 24 h. Data are means \pm SD of 3 replicates of the same subculture. Comparison test is Student's *t*-test.

Figure 5.7 Effect of pretreatment with 3 mM BSO and 10 μ M Cd on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days and were then pretreated with various experimental conditions before exposure to increasing concentrations of Cd. Both pretreatment and exposure were 24 h in the absence of FBS. Data are means \pm SD of 3 independent cell cultures. Comparison tests were ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 5.8 Effect of pretreatment with 30 μ M diamide, 30 μ M BCNU and 10 μ M Cd on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days and were then pretreated with various experimental conditions before exposure to increasing concentrations of Cd. Both pretreatment and exposure were 24 h in the absence of FBS. Data are means \pm SD of 3 independent experiments. Comparison tests were ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 5.9 Effect of exposure to Cd on CAT activity. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days and were then exposed to 1, 5, 10, 15, or 20 μ M Cd for 24 h in the absence of FBS. Data are means \pm SD of 3 independent cell cultures. Comparison test is Student's *t*-test ($r^2 = 0.80$).

Figure 5.10 Basal CAT and GPx activities in 7-day-old proliferative cells measured as rate of decrease of hydrogen peroxide (CAT) and of cumene hydroperoxide (GPx). Data shown are means \pm SD of 3 replicates on the same subculture.

Figure 5.11 Effect of pretreatment with 100 mM 3AT and 10 μ M Cd on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days and were then pretreated with various experimental conditions before exposure to increasing concentrations of Cd. Both pretreatment and exposure were 24 h in the absence of FBS. Data are means \pm SD of 3 independent experiments. Comparison tests were ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 5.12 Effect of pretreatment with 100 μ M Zn or 10 μ M Cd on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days and were then pre-exposed to 100 μ M Zn or 10 μ M Cd before a subsequent exposure to increasing concentrations of Cd. Both pre-exposure and exposure were 24 h in the absence of FBS. Data are means \pm SD of 3 independent experiments. Comparison tests were ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 5.13 Effect of pretreatment with 1 μ M CHX and 100 μ M Zn on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days and were then pretreated with various experimental conditions before exposure to increasing concentrations of Cd. Both pretreatment and exposure were 24 h in the absence of FBS. Data are means \pm SD of 3 independent experiments. Comparison tests were ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 5.14 Effect of pretreatment with 3 mM BSO and 100 μ M Zn on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days and were then pretreated with various experimental conditions before exposure to increasing concentrations of Cd. Both pretreatment and exposure were 24 h in the absence of FBS. Data are means \pm SD of 3 independent experiments. Comparison tests were ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Figure 5.15 Effect of pretreatment with 100 mM 3AT and 100 μ M Zn on MTT activity in response to a subsequent exposure to Cd. Cells were cultured in the presence of FBS for 6 days and were then pretreated with various experimental conditions before exposure to increasing concentrations of Cd. Both pretreatment and exposure were 24 h in the absence of FBS. Data are means \pm SD estimated on 3 independent cell cultures. Comparison tests were ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

5.8 Figures

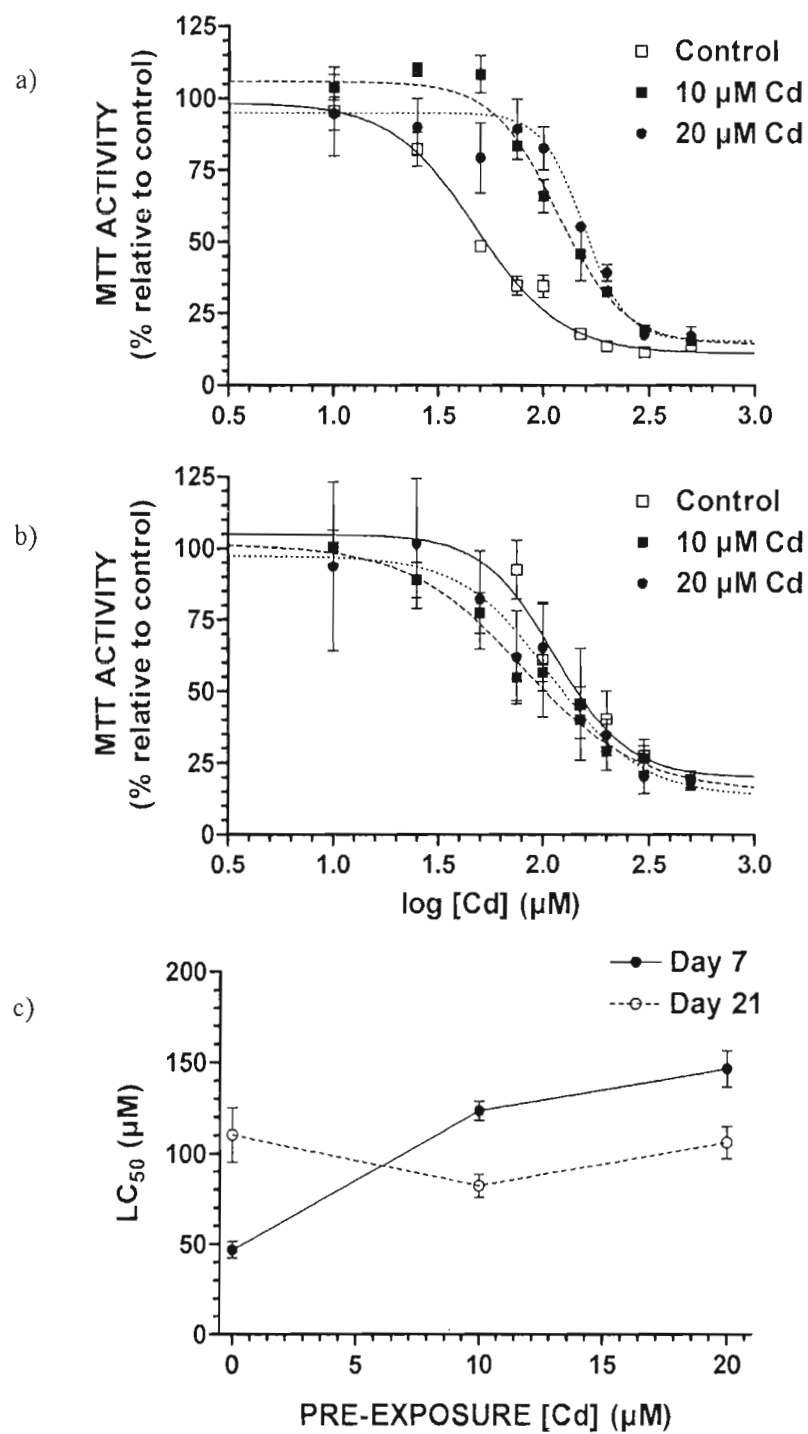


Figure 5.1

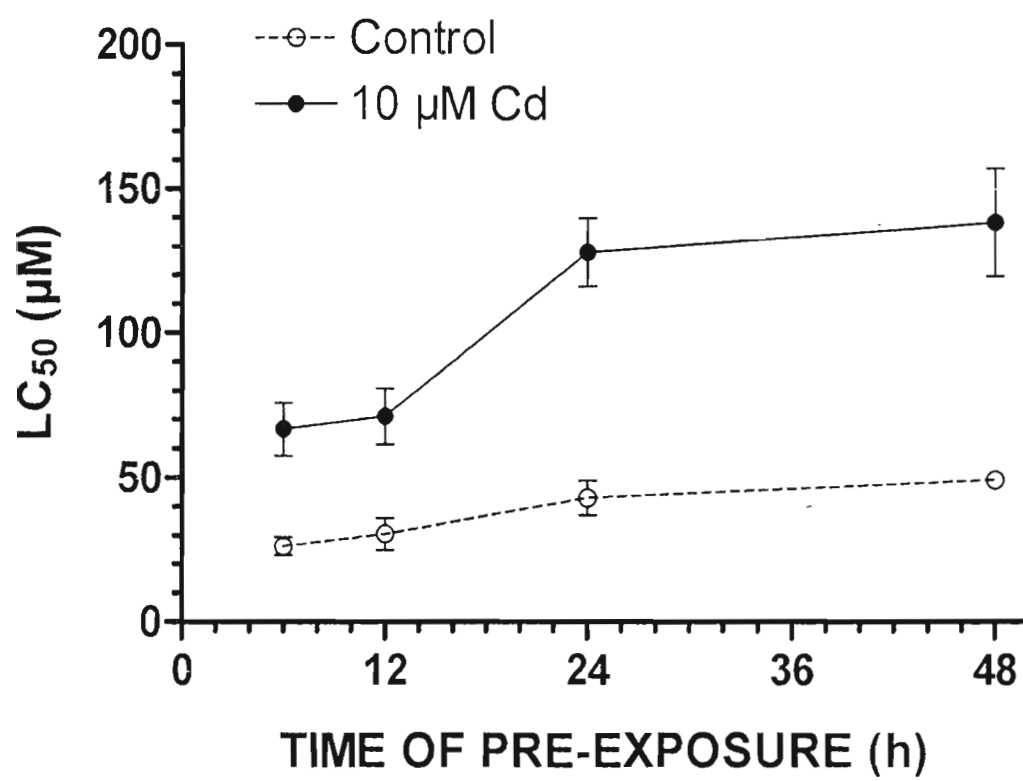


Figure 5.2

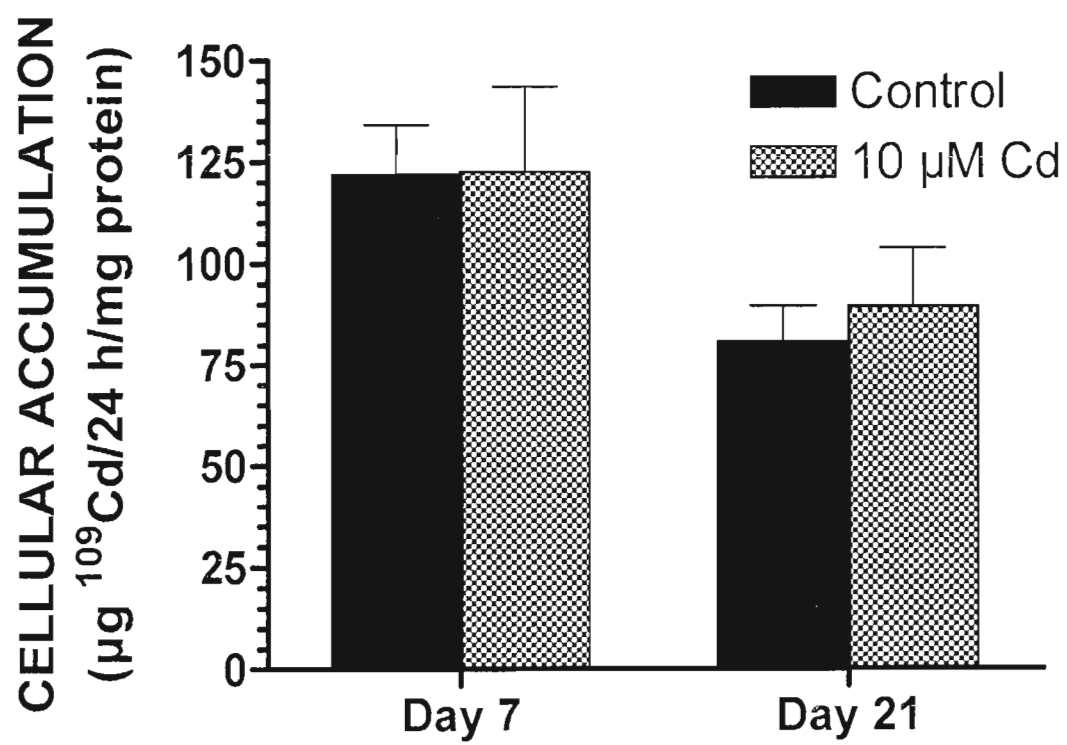


Figure 5.3

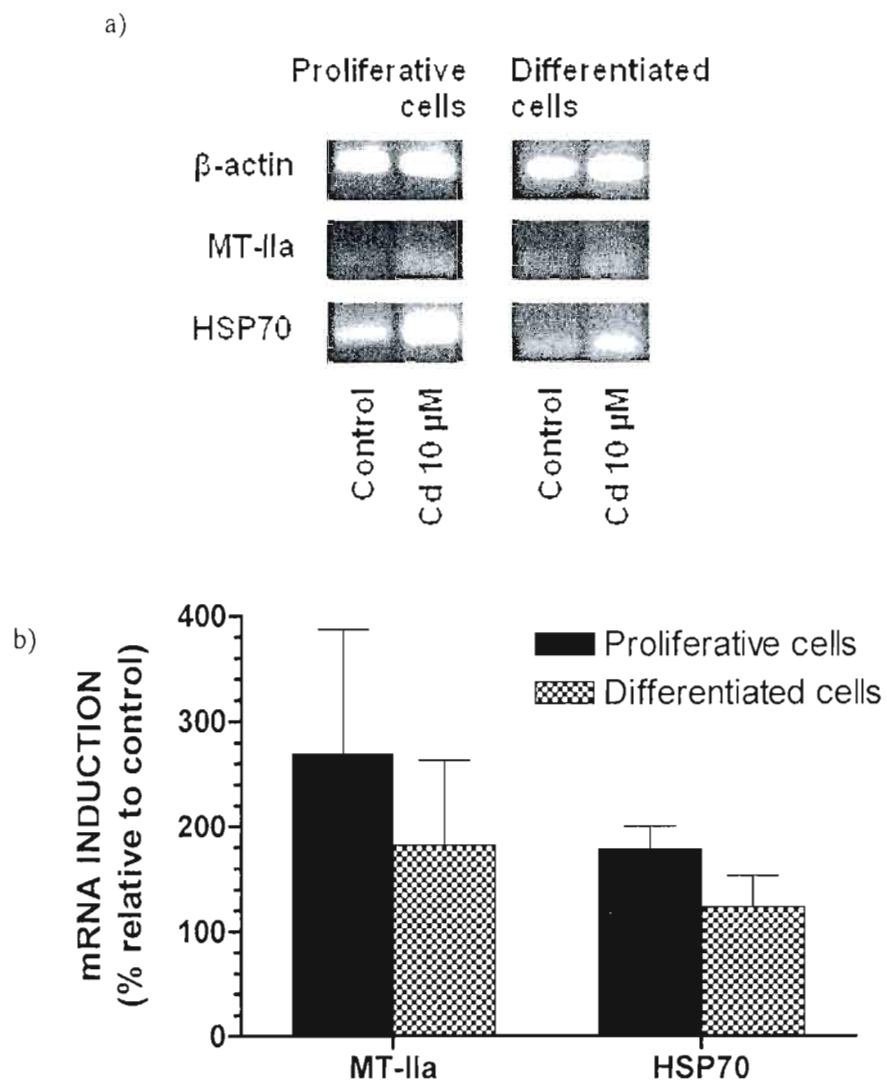


Figure 5.4

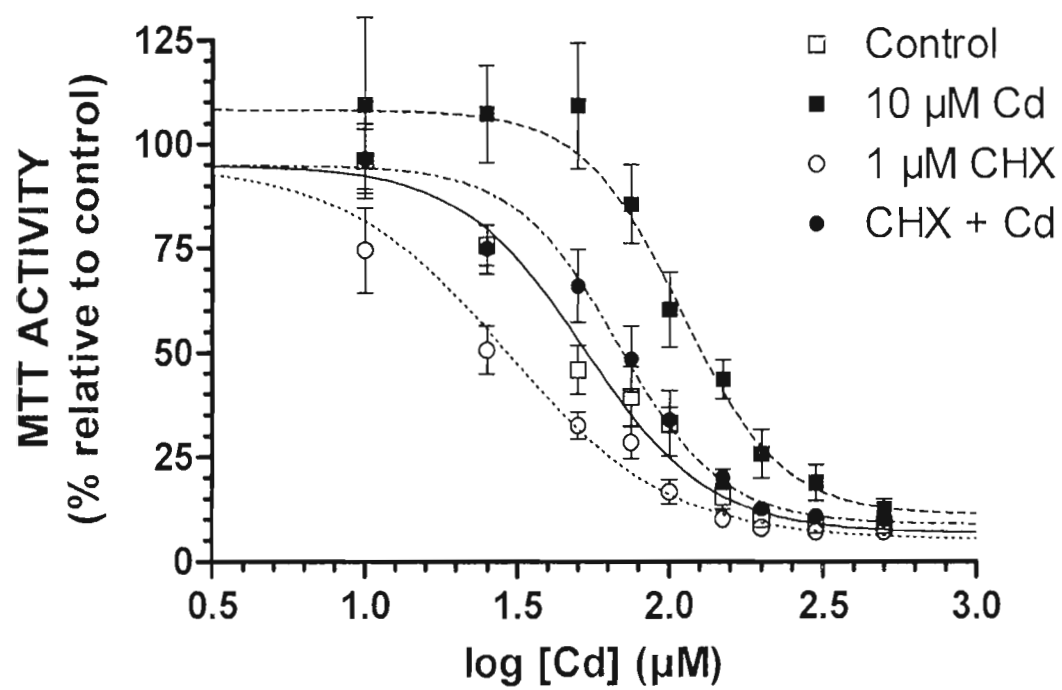


Figure 5.5

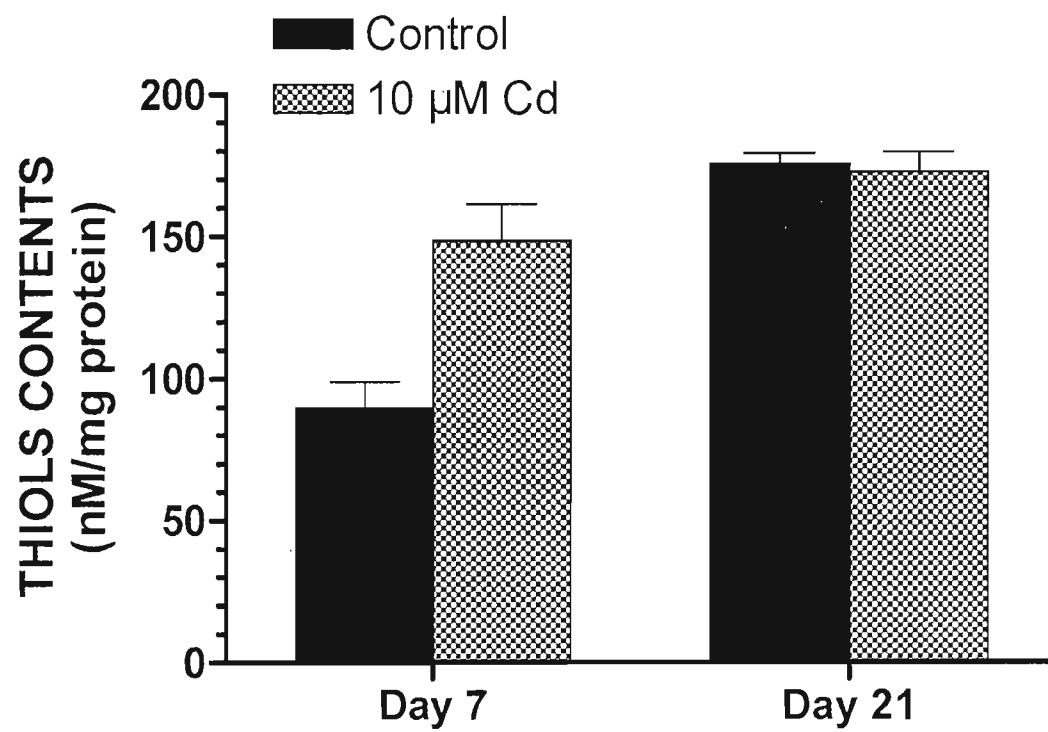


Figure 5.6

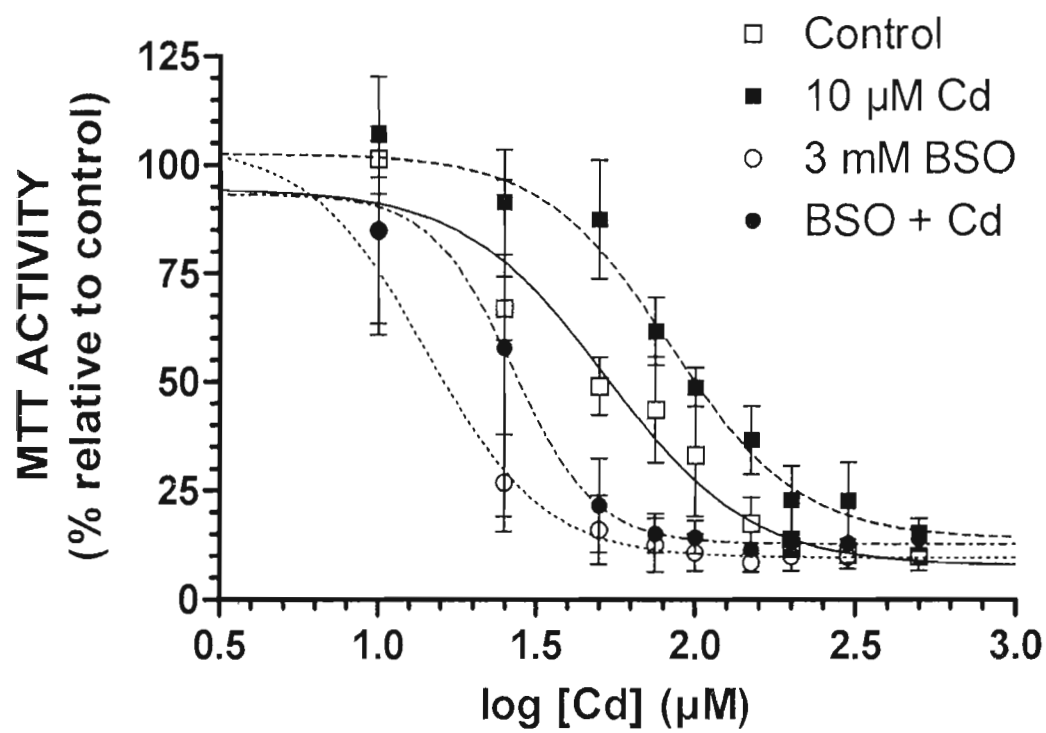


Figure 5.7

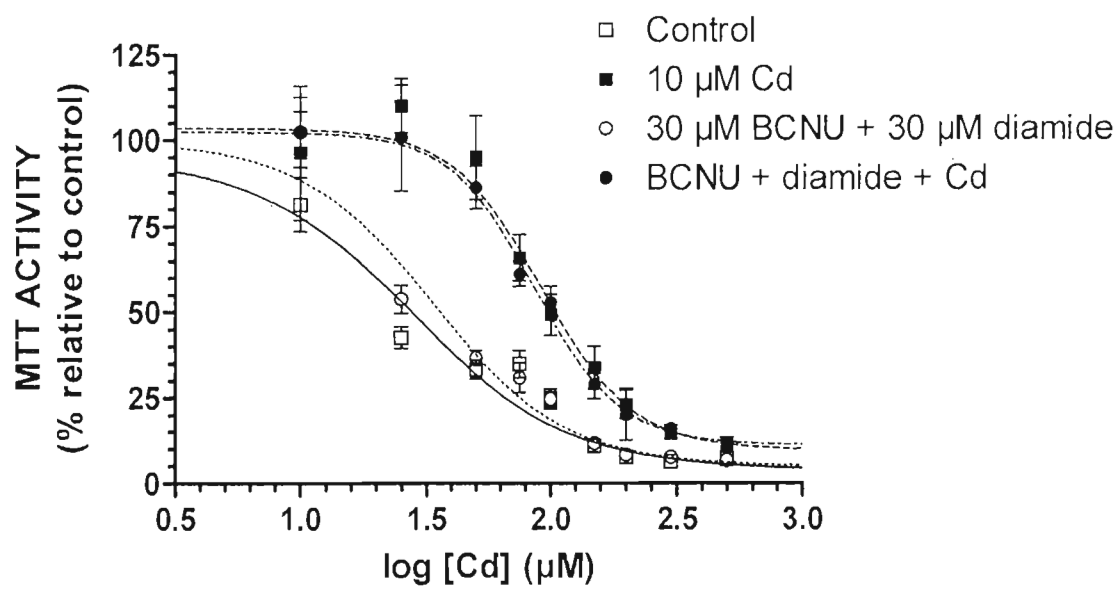


Figure 5.8

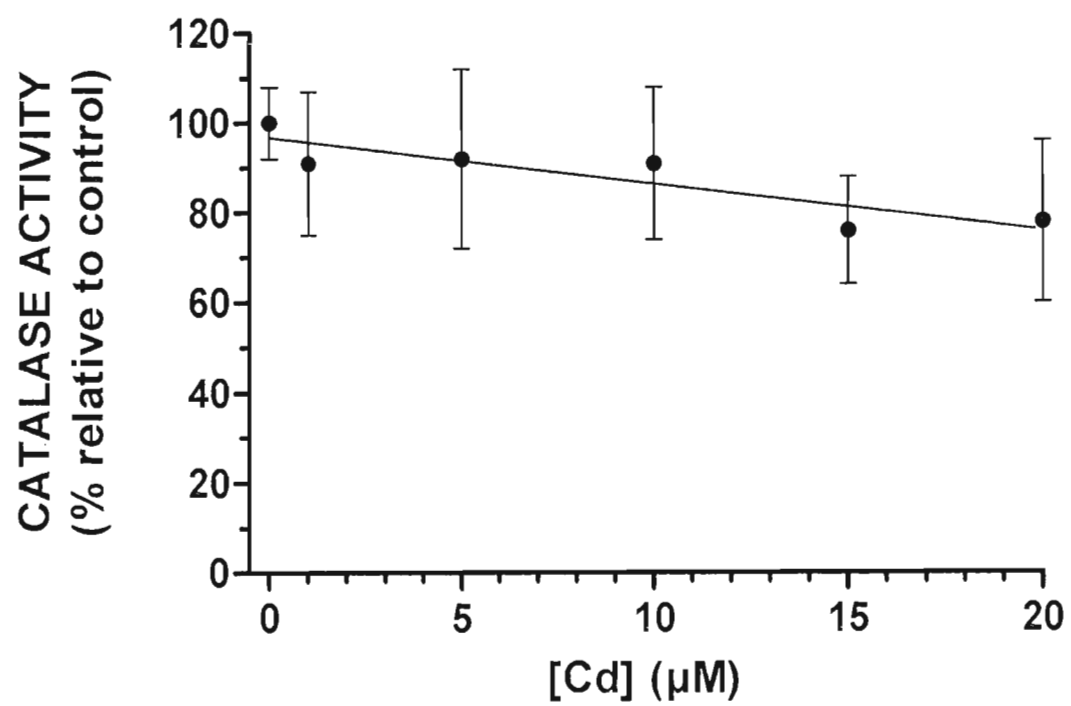


Figure 5.9

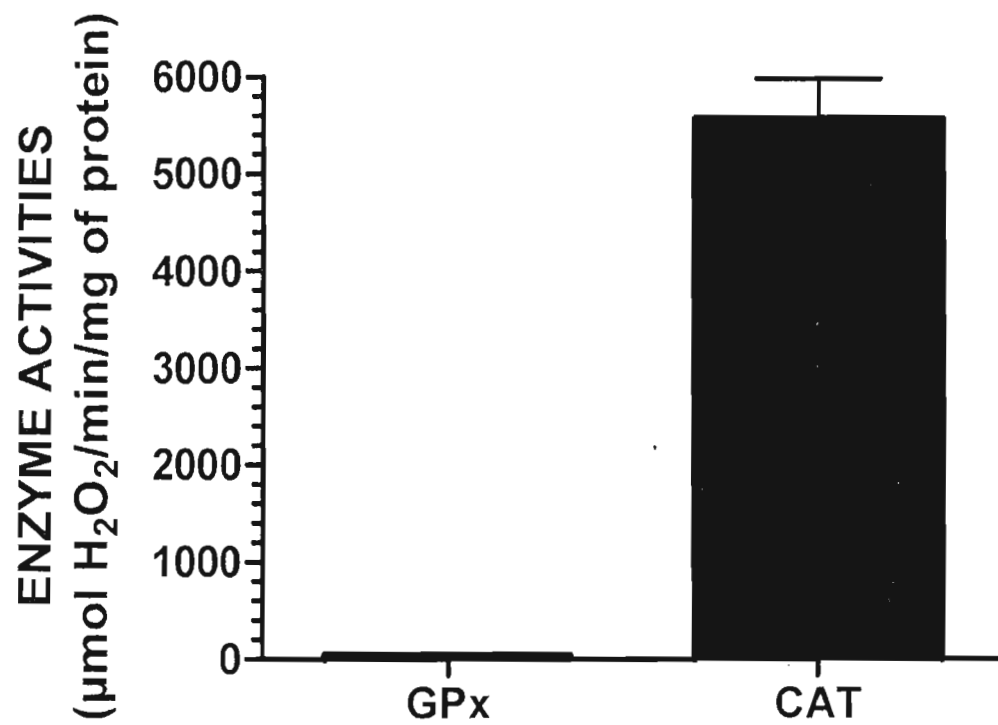


Figure 5.10

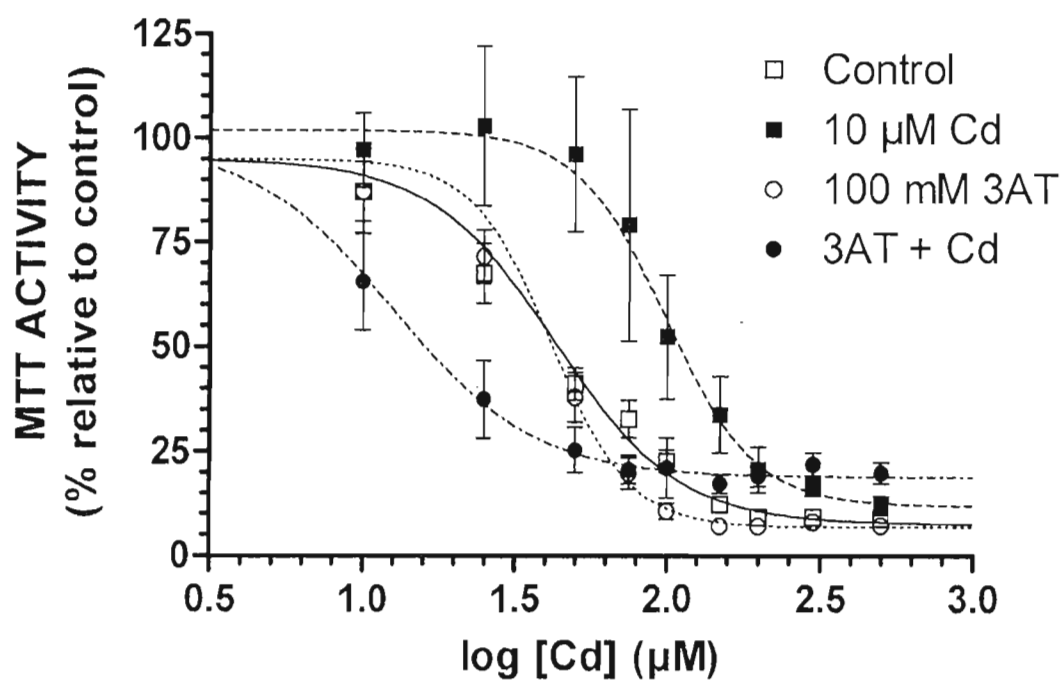


Figure 5.11

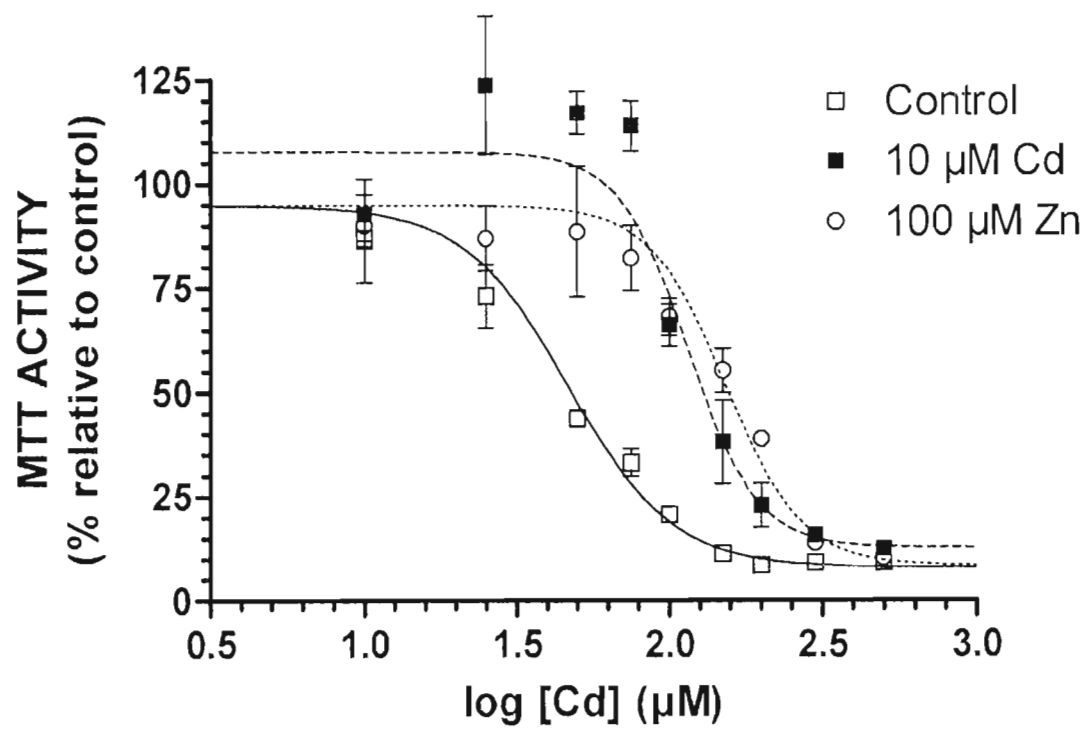


Figure 5.12

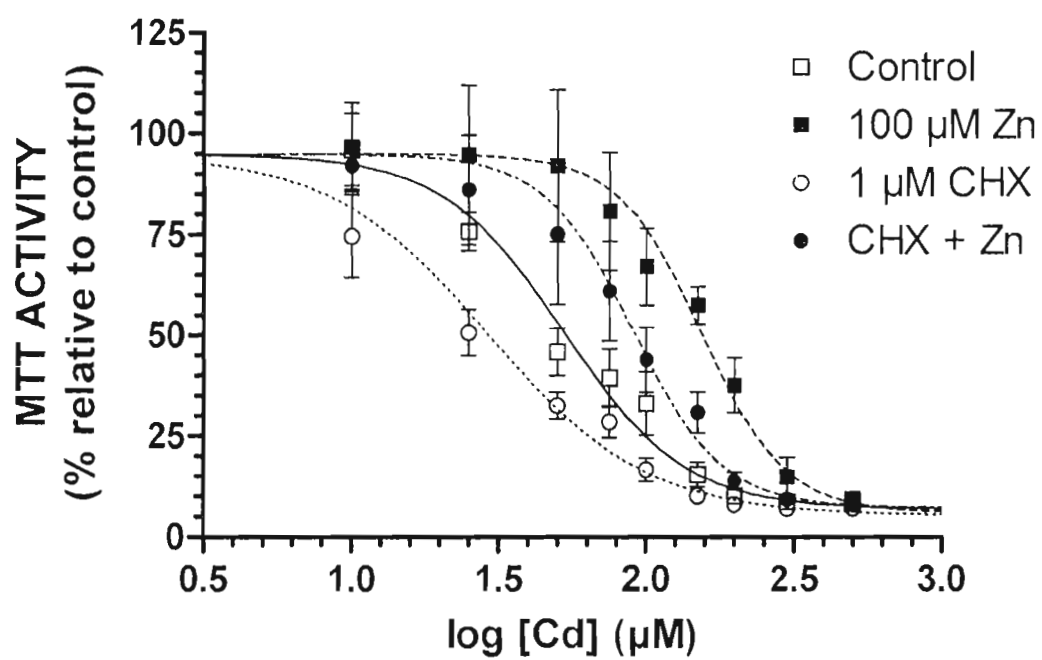


Figure 5.13

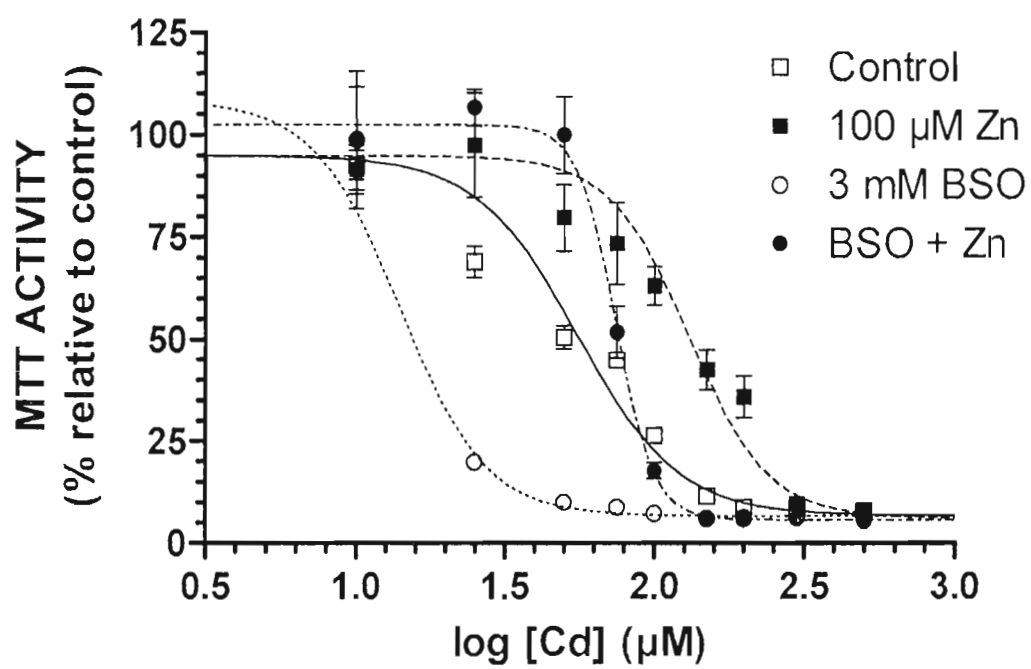


Figure 5.14

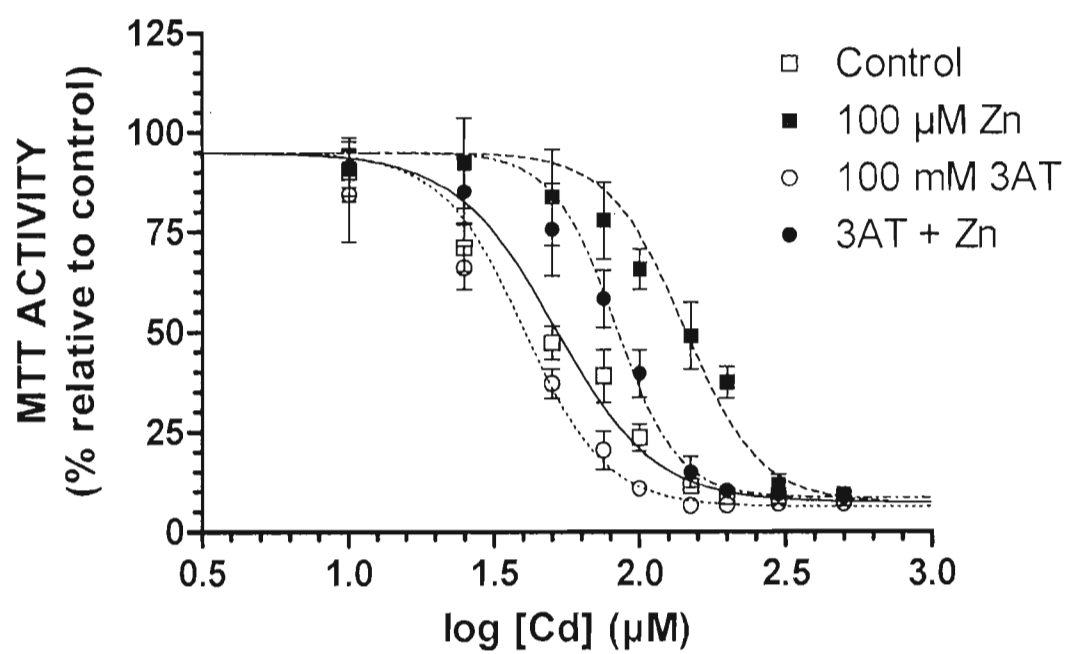


Figure 5.15

CHAPITRE VI

DISCUSSION

6.1. Retour sur les hypothèses

La première hypothèse posée dans cette étude était que le stress oxydatif est impliqué dans le mécanisme de résistance acquise des cellules prolifératives, ce stress étant induit par le Cd. Le H_2O_2 étant vraisemblablement l'espèce réactive de l'oxygène principale impliquée dans la toxicité du Cd (Yang *et al.*, 1997), il était logique d'étudier particulièrement la CAT qui est la principale enzyme antioxydante détoxiquant les cellules Caco-2 du H_2O_2 . À ce sujet, nos résultats sont plutôt surprenants. Pourquoi une inhibition de la CAT ne sensibilise pas les cellules à la toxicité aiguë du Cd alors qu'en co-exposition avec seulement 10 μM de Cd, une sensibilisation radicale est observée lors d'une exposition subséquente au Cd? Une sensibilisation des cellules à la toxicité aiguë après un prétraitement au 3AT seul était attendue, puisque le H_2O_2 est théoriquement très important dans la toxicité du Cd et que 100 mM de 3AT inhibe la presque totalité de l'activité de la CAT selon nos études préliminaires. Aucune sensibilisation n'a cependant été observée. De plus, que se passe-t-il durant le co-traitement avec 10 μM de Cd pour provoquer un changement aussi radical alors qu'aucun changement n'est observé avec le 3AT seul? Est-ce que la GSH-Px prend le relais de la CAT, causant une réduction du rapport GSH/GSSG intracellulaire malgré la GSH réductase et sensibilisant ainsi les cellules à une exposition subséquente au Cd? Cette hypothèse semblait plausible puisqu'une inhibition de la production de GSH par le BSO sensibilise les cellules à la toxicité aiguë du Cd, mais elle est plutôt infirmée par nos résultats obtenus avec le BCNU et le diamide qui n'ont causé aucune sensibilisation des cellules. Plusieurs questions demeurent quant à l'effet du 3AT sur le prétraitement à 10 μM Cd et de futures études nous

éclairerons possiblement à ce sujet. Par ailleurs, nos résultats obtenus avec le BSO, le BCNU et le diamide démontrent l'importance capitale de la production de GSH *de novo* comparativement au pool de GSH intracellulaire dans la tolérance à une exposition aiguë au Cd, malgré que cette production ne soit pas impliquée dans l'induction d'une résistance acquise. L'hypothèse initiale sur l'implication du stress oxydatif dans le processus de résistance acquise n'est donc ni infirmée, ni confirmée hors de tout doute. L'absence de résistance acquise en absence de CAT active est cependant un bon point de départ pour de futures études testant cette hypothèse.

La deuxième hypothèse posée dans cette étude était que la MT-IIa et la HSP70 ne sont pas essentielles au processus de résistance acquise des cellules prolifératives. Plusieurs études ont démontré ce fait dans différents modèles cellulaires ainsi que *in vivo* (Tang *et al.*, 1998; Croute *et al.*, 2000; Lau *et al.*, 2006) et nos résultats suggèrent fortement que la lignée cellulaire Caco-2 ne fait pas exception.

La dernière hypothèse posée dans cette étude était que les résistances induites par le Zn et le Cd impliquent des processus différents. Une différence majeure a été notée à ce sujet au niveau du rôle d'une CAT active. Le Zn étant reconnu comme antioxydant et non comme prooxydant (Szuster-Ciesielska *et al.*, 2000; Zödl, *et al.*, 2003; Ilbert *et al.*, 2006), il est logique qu'une inhibition de la CAT n'ait aucun effet sur la résistance acquise en présence de Zn. Nous croyons que la différence dans l'induction de la résistance acquise entre ces deux métaux est que le Zn induit une résistance par son action antioxydante et l'augmentation de l'activité d'enzymes antioxydantes comme la GSH-Px (Zödl, *et al.*, 2003) et par d'autres mécanismes détaillés à la section 2.5, tandis que la résistance induite en présence de Cd serait plutôt causée en réponse au stress oxydant induit par celui-ci. Ainsi, inhiber la CAT augmenterait le niveau de stress généré par le Cd au point d'altérer la capacité des cellules à développer une résistance.

6.2. Retour sur la méthodologie

De nombreuses techniques ont été utilisées dans cette étude et ont permis d'évaluer de nombreux paramètres différents et de suggérer de nombreuses pistes d'investigation pour tenter d'expliquer l'induction de la tolérance au Cd dans les cellules Caco-2 prolifératives.

Pour ce qui est du choix de la lignée cellulaire Caco-2, nous sommes pleinement conscients des limitations imposées dans l'interprétation des résultats par l'utilisation d'une lignée cellulaire cancéreuse, mais nous croyons qu'il s'agit du meilleur choix disponible présentement pour étudier les cellules de l'épithélium intestinal en fonction de leur stade de différenciation entérocytaire.

Finalement, il sera nécessaire de compléter les analyses d'apoptose effectuées par marquage d'ADN à l'iodure de propidium avec des analyses par un marquage combiné à l'iodure de propidium et à l'annexine V-FITC (Fluorescéine isothiocyanate) permettant de bien distinguer les cellules normales, les cellules en début d'apoptose, les cellules en apoptose tardive ou en nécrose et les cellules mortes (Chen *et al.*, 2008).

6.3. Perspectives

De futures études visant à déterminer le ou les mécanismes d'adaptation au Cd par un prétraitement à 10 μ M Cd devront clarifier l'effet du 3AT sur ce prétraitement. Nos résultats préliminaires (données non montrées) obtenus avec des concentrations croissantes de 3AT lors du prétraitement des cellules à 10 μ M de Cd suggèrent que la diminution de la LC50 serait possiblement dose-dépendante à la concentration de 3AT. Cette étude permet d'envisager une relation entre l'activité de la CAT lors d'un prétraitement à 10 μ M de Cd et la tolérance à une toxicité aiguë subséquente. Des analyses plus approfondies sont nécessaires mais nous croyons qu'en absence de CAT active, le stress provoqué par une pré-exposition à 10 μ M de Cd devient néfaste pour les cellules.

Faire varier la concentration du prétraitement au Cd de 1 à 10 μ M en absence et en présence de 100 mM de 3AT révèle également des résultats intéressants (données non montrées). Nous observons qu'en absence de 3AT, l'induction d'une résistance acquise est observable à de très faibles concentrations de Cd avec, une résistance non-significative mais très reproductible à 1 μ M Cd, une résistance significative à partir de 3 μ M de Cd et l'atteinte d'un plateau pour des concentrations supérieures à 5 μ M de Cd. Lors du co-traitement avec 100 mM de 3AT, la LC50 des cellules prolifératives demeure stable lors de prétraitements variant entre 0 et 5 μ M de Cd pour ensuite diminuer. D'autres analyses sont nécessaires pour expliquer ces résultats.

L'utilisation de siRNA (*small interfering RNA*) de MT-IIa et de HSP70 a été tentée lors de cette étude mais sans succès. Notre siRNA de MT-IIa diminuait la quantité d'ARNm correspondant dans les cellules témoins, mais ne semblait pas empêcher l'induction de la synthèse de celui-ci lors d'une exposition à 10 μ M. Notre siRNA de HSP70 n'a pas fonctionné. Perfectionner et inclure ce volet à de futures études serait cependant très intéressant. Nous avons également tenté d'inhiber la GSH-Px, mais l'inhibiteur utilisé, le mercaptosuccinate, n'était pas spécifique. En effet, à une concentration de 100 mM, il inhibe l'activité de la GSH-Px d'environ 21 % tout en inhibant également l'activité de la CAT d'environ 33 %.

Finalement, nos résultats soulèvent plusieurs autres questions. Par exemple, pourquoi n'y a-t-il pas de résistance induite dans les cellules différenciées? Est-ce que des métaux libérés de leurs sites de liaisons, comme le Fe, ont un impact sur l'induction de la résistance acquise? Quelles sont les implications *in vivo* de cette résistance? Comment pourrait-on étudier cette résistance acquise *in vivo*? Nous croyons cependant que la prochaine étape logique est de clarifier l'effet de la 3AT sur le processus de résistance acquise.

CONCLUSION

L'objectif de cette recherche était d'étudier l'implication du stress oxydant dans les mécanismes de résistance acquise au Cd lors d'un prétraitement à 10 μ M de Cd, ainsi que dans la toxicité aiguë du Cd, en fonction du stade de différenciation entérocytaire des cellules Caco-2. Les différentes techniques utilisées lors de cette étude se sont avérées très utiles afin d'évaluer l'implication du stress oxydant et des protéines de stress dans la résistance acquise au Cd des cellules Caco-2 prolifératives, soit des techniques: i) de culture cellulaire, ii) d'analyse de viabilité cellulaire par mesures de réduction de MTT, iii) d'analyse par RT-PCR, iv) de mesure d'activité de la CAT et de la GSH-PX, v) de quantification de thiols intracellulaires, vi) de mesure d'accumulation cellulaire de ^{109}Cd et vii) d'analyse par cytofluorométrie de flux. Le rôle du stress oxydatif dans la toxicité aiguë du Cd a été clairement démontré dans cette étude, mais des études supplémentaires sont nécessaires afin de prouver une éventuelle implication dans les mécanismes de résistance acquise. L'effet préventif du GSH produit *de novo*, de la MT-IIa et de la HSP70 contre la toxicité aiguë du Cd a été observée, malgré que ces protéines ne semblent pas être impliquées dans l'induction d'une résistance acquise. La CAT active semble cependant nécessaire pour l'induction de cette résistance par le Cd, mais pas par le Zn, suggérant des mécanismes d'action différents pour ces deux métaux. Clarifier l'effet de l'inhibition de la CAT lors du prétraitement au Cd est certainement une bonne piste pour étudier l'induction des mécanismes d'adaptation au Cd dans les cellules prolifératives Caco-2. Clarifier comment la résistance au Cd augmente avec le niveau de différenciation mais pourquoi les cellules différenciées deviennent incapables à développer une tolérance supplémentaire mérite aussi d'être étudié. L'adaptation des cellules prolifératives des cryptes pourrait constituer un mécanisme de protection supplémentaire *in vivo* considérant le renouvellement rapide de l'épithélium intestinal. Évaluer si l'absence de processus de résistance dans les entérocytes a un impact sur la fonction intestinale serait, à long terme, une étude à mener.

RÉFÉRENCES

- Adam-Vizi V. 2005. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal*. 7: 1140-1149.
- Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. 2007. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine*. 74: 324-329.
- Alhamdani, MS. 2005. Impairment of glutathione biosynthetic pathway in uraemia and dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 20: 124-128.
- Almazan G, Liu HN, Khorchid A, Sundararajan S, Martinez-Bermudez AK, Chemtob S. 2000. Exposure of developing oligodendrocytes to cadmium causes HSP72 induction, free radical generation, reduction in glutathione levels, and cell death. *Free Radic Biol Med*. 29: 858-869.
- Andersen O, Nielsen JB, Sorensen JA, Scherrebeck L. 1994. Experimental localization of intestinal uptake sites for metals (Cd, Hg, Zn, Se) in vivo in mice. *Environ Health Perspect*. 102 Suppl 3: 199-206.
- Anderson ME. 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol*. 113: 548-555.
- Andreu P, Perret C, Romagnolo B. 2006. Wnt and gastrointestinal stem cells: dangerous connections. *Med Sci (Paris)*. 22: 693-695.
- Aw TY. 2005. Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol Appl Pharmacol*. 204: 320-328.
- Baker RD, Baker SS, LaRosa K. 1995. Polarized Caco-2 cells. Effect of reactive oxygen metabolites on enterocyte barrier function. *Dig Dis Sci*. 40: 510-518.
- Baker SS, Baker RD. 1992. Antioxidant enzymes in the differentiated Caco-2 cell line. *In Vitro Cell Dev Biol*. 28A: 643-647.
- Beaulieu JF, Quaroni A. 1991. Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem J*. 280: 599-608.

Bergeron PM, Jumarie C. 2006. Characterization of cadmium uptake in human intestinal crypt cells HIEC in relation to inorganic metal speciation. *Toxicology*. 219: 156-166.

Berzina N, Markovs J, Isajevs S, Apsite M, Smirnova G. 2007. Cadmium-induced enteropathy in domestic cocks: a biochemical and histological study after subchronic exposure. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 101: 29-34.

Bestwick CS, Milne L. 2001. Alteration of culture regime modifies antioxidant defenses independent of intracellular reactive oxygen levels and resistance to severe oxidative stress within confluent Caco-2 "intestinal cells". *Dig Dis Sci*. 46: 417-423.

Blais A, Lecoœur S, Milhaud G, Tomé D, Kolf-Clauw, M. 1999. Cadmium uptake and transepithelial transport in control and long-term exposed Caco-2 cells: the role of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol*. 160: 76-85.

Bolduc JS, Denizeau F, Jumarie C. 2004. Cadmium-induced mitochondrial membrane-potential dissipation does not necessarily require cytosolic oxidative stress: studies using rhodamine-123 fluorescence unquenching. *Toxicol Sc*. 77: 299-306.

Bossé Y, Joanisse DR, Boulay MR. 2003. Modulations rédox de la contraction musculaire. *Science et motricité*. 50: 7-31.

Boveri M, Pazos P, Gennari A, Casado J, Hartung T, Prieto P. 2004. Comparison of the sensitivity of different toxicological endpoints in Caco-2 cells after cadmium chloride treatment. *Arch Toxicol*. 78: 201-206.

Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*. 47: 936-942.

Casalino E, Calzaretti G, Sblano C, Landriscina C. 2002. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*. 179: 37-50.

Casalino E, Sblano C, Landriscina C. 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*. 346: 171-179.

Chen S, Cheng AC, Wang MS, Peng X. 2008. Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling. *World J Gastroenterol*. 14: 2174-2178.

Croute F, Beau B, Arrabit C, Gaubin Y, Delmas F, Murat JC, Soleilhavoup JP. 2000. Pattern of stress protein expression in human lung cell-line A549 after short- or long-term exposure to cadmium. *Environ Health Perspect.* 108: 55-60.

Cuénod-Jabri B, Patey N, Goulet O, Canioni D, Guy-Grand D, Schmitz J, Brousse N, Cerf-Bensussan N. 1997. Les atrophies villositaires intestinales immunes et non immunes. *Rev Méd Interne.* 18: 418-420.

Dorval J, Hontela A. 2003. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol Appl Pharmacol.* 192: 191-200.

Duizer E, Gilde AJ, Versantvoort CH, Groten JP. 1999. Effects of cadmium chloride on the paracellular barrier function of intestinal epithelial cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 155: 117-126.

Elbekai RH, El-Kadi AO. 2005. The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As³⁺, Cd²⁺, and Cr⁶⁺. *Free Radic Biol Med.* 39: 1499-1511.

Elinder CG.. 1992. Cadmium as an environmental hazard. *IARC Sci Publ.* 118: 123-132.

Elisma F, Jumarie C. 2001. Evidence for cadmium uptake through Nramp2: metal speciation studies with Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 285: 662-668.

Fleischer M, Sarofim AF, Fassett DW, Hammond P, Shacklette HT, Nisbet IC, Epstein S. 1974. Environmental impact of cadmium: a review by the Panel on Hazardous Trace Substances. *Environ Health Perspect.* 7: 253-323.

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst.* 59: 221-226.

Fowler BA. 1993. Mechanisms of kidney cell injury from metals. *Environ Health Perspect.* 100: 57-63.

Friberg L. 1984. Cadmium and the kidney. *Environ Health Perspect.* 54: 1-11.

Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JC, Vézina A, Vachon PH. 2001. Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280: C1540-C1554.

Gout S, Marie C, Lainé M, Tavernier G, Block MR, Jacquier-Sarlin M. 2004. Early enterocytic differentiation of HT-29 cells: biochemical changes and strength increases of adherens junctions. *Exp Cell Res.* 299: 498-510.

Goyer RA. 1995. Nutrition and metal toxicity. *Am J Clin Nutr.* 61: 646s-650s.

- Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D. 1994. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci.* 107: 3569-3577.
- Hamilton KL. 2007. Antioxidants and cardioprotection. *Med Sci Sports Exerc.* 39: 1544-1553.
- Hawse JR, Padgaonkar VA, Leverenz VR, Pelliccia SE, Kantorow M, Giblin FJ. 2006. The role of metallothionein IIa in defending lens epithelial cells against cadmium and TBHP induced oxidative stress. *Mol Vis.* 12: 342-349.
- Hsu PC, Guo YL. 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology.* 180: 33-44.
- Huang LE, Zhang H, Bae SW, Liu AY. 1994. Thiol reducing reagents inhibits the heat shock response. Involvement of a redox mechanism in heat shock signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 269: 30718-30725.
- Huynh-Delerme C, Huet H, Noël L, Frigieri A, Kolf-Clauw M. 2005. Increased functional expression of P-glycoprotein in Caco-2 TC7 cells exposed long term to cadmium. *Toxicol In Vitro.* 19: 439-447.
- Hyun JS, Satsu H, Shimizu M. 2007. Cadmium induces interleukin-8 production via NF-kappaB activation in the human intestinal epithelial cell, Caco-2. *Cytokine.* 37: 26-34.
- IARC. 1993. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. *IARC Sci Pub.* 58: 119-238.
- Ilbert M, Graf PC, Jakob U. 2006. Zinc center as redox switch—new function for an old motif. *Antioxid Redox Signal.* 8: 835-846.
- Ishii N. 2007. Role of oxidative stress from mitochondria on aging and cancer. *Cornea.* 26: S3-S9.
- Jacobs P, Wood L. 2004. Macronutrients cadmium. *Disease-a-month.* 50: 46-50.
- Jing H, Kitts DD. 2004. Redox-related cytotoxic responses to different casein glycation products in Caco-2 and int-407 cells. *J Agric Food Chem.* 52: 3577-3582.
- Johnson F, Giulivi C. 2005. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med.* 26: 340-352.
- Jumarie C, Campbell PG, Berteloot A, Houde M, Denizeau F. 1997. Caco-2 cell line used as an in vitro model to study cadmium accumulation in intestinal epithelial cells. *J Membr Biol.* 158: 31-48.
- Jumarie C, Campbell PG, Houde M, Denizeau F. 1999. Evidence for an intracellular barrier to cadmium transport through Caco-2 cell monolayers. *J Cell Physiol.* 180: 285-297.

- Jumarie C, Malo C. 1991. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J Cell Physiol.* 149: 24-33.
- Kameoka S, Leavitt P, Chang C, Kuo SM. 1999. Expression of antioxidant proteins in human intestinal Caco-2 cells treated with dietary flavonoids. *Cancer Lett.* 146: 161-167.
- Kang YJ, Enger MD. 1991. Cadmium inhibits EGF-induced DNA synthesis but increases cellular glutathione levels in NRK-49F cells. *Toxicology.* 66: 325-333.
- Karam SM. 1999. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci.* 4: D286-D298.
- Kiang JG, Tsokos GC. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther.* 80: 183-201.
- Klaassen CD. 2001. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 6th edition. McGraw-Hill, New York.
- Klaassen CD, Liu J. 1997. Role of metallothionein in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Drug Metab Rev.* 29: 79-102.
- Lau AT, Zhang J, Chiu JF. 2006. Acquired tolerance in cadmium-adapted lung epithelial cells: roles of the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway and basal level of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol.* 215: 1-8.
- Lauwerys RR, Bernard AM, Roels HA, Buchet JP. 1994. Cadmium: exposure markers as predictors of nephrotoxic effects. *Clin Chem.* 40: 1391-1394.
- Liu J, Zhang Y, Huang D, Song G. 2005. Cadmium induced MTs synthesis via oxidative stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem.* 280: 139-145.
- Loeffler M, Birke A, Winton D, Potten C. 1993. Somatic mutation, monoclonality and stochastic models of stem cell organization in the intestinal crypt. *J Theor Biol.* 160: 471-491.
- Mackenzie B, Takanaga H, Hubert N, Rolfs A, Hediger MA. 2007. Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochem J.* 403: 59-69.
- Mata L, Sanchez L, Calvo M. 1996. Cadmium uptake by Caco-2 cells. Effect of some milk components. *Chem Biol Interact.* 100: 277-288.
- Maury J, Nicoletti C, Guzzo-Chambrud L, Maroux S. 1995. The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyper-polarization. *Eur J Biochem.* 228: 323-331.
- Meunier V, Bourrié M, Berger Y, Fabre G. 1995. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol.* 11: 187-194.

- Miura N, Koizumi S. 2007. Heavy metal responses of the human metallothionein isoform genes. *Yakugaku Zasshi*. 127: 665-673.
- Moller IM, Kristensen BK. 2004. Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochem Photobiol Sci*. 3: 730-735.
- Murata M, Gong P, Suzuki K, Koizumi S. 1999. Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. *J Cell Physiol*. 180: 105-113.
- Murphy MP. 1999. Nitric oxide and cell death. *Biochim Biophys Acta*. 1411: 401-414.
- Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Aw TY. 2001. Induction of mild intracellular redox imbalance inhibits proliferation of Caco-2 cells. *FASEB J*. 15: 2131-2139.
- Nordberg M. 1984. General aspects of cadmium: transport, uptake and metabolism by the kidney. *Environ Health Perspect*. 54: 13-20.
- O'Brien P, Salacinski HJ. 1998. Evidence that the reactions of cadmium in the presence of metallothionein can produce hydroxyl radicals. *Arch Toxicol*. 72: 690-700.
- Parikh AA, Moon MR, Kane CD, Salzman AL, Fischer JE, Hasselgren PO. 1998. Interleukin-6 production in human intestinal epithelial cells increases in association with the heat shock response. *J Surg Res*. 77: 40-44.
- Perreault N, Beaulieu JF. 1996. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res*. 224: 354-364.
- Perreault N, Beaulieu JF. 1998. Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res*. 245: 34-42.
- Pham TN, Marion M, Denizeau F, Jumarie C. 2006. Cadmium-induced apoptosis in rat hepatocytes does not necessarily involve caspase-dependant pathways. *Toxicol In Vitro*. 20: 1331-1342.
- Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assman P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. 1983. Enterocytic-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell*. 47: 323-330.
- Rao R, Baker RD, Baker SS. 1999. Inhibition of oxidant-induced barrier disruption and protein tyrosine phosphorylation in Caco-2 cell monolayers by epidermal growth factor. *Biochem Pharmacol*. 57: 685-695.
- Rutkowski R, Pancewicz SA, Rutkowski K, Rutkowska J. 2007. Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process. *Pol Merkur Lekarski*. 23: 131-136.

- Samson SL, Gedamu L. 1998. Molecular analyses of metallothionein gene regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 59: 257-288.
- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative stress systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiol*. 127: 887-898.
- Shi H, Sui Y, Wang X, Luo Y, Ji L. 2005. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 140: 115-121.
- Snoeck V, Goddeeris B, Cox E. 2005. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect*. 7: 997-1004.
- Souza V, Escobar MDC, Bucio L, Hernández E, Gutiérrez-Ruiz MC. 2004. Zinc pretreatment prevents hepatic stellate cells from cadmium-produced oxidative damage. *Cell Biol Toxicol*. 20: 241-251.
- Souza V, Escobar MDC, Gómez-Quiroz L, Bucio L, Hernández E, Cossio EC, Gutiérrez-Ruiz MC. 2004. Acute cadmium exposure enhances AP-1 DNA binding and induces cytokines expression and heat shock protein 70 in HepG2 cells. *Toxicology*. 197: 213-228.
- Spitz DR, Dewey WC, Li GC. 1987. Hydrogen peroxide or heat shock induces resistance to hydrogen peroxide in Chinese hamster fibroblasts. *J Cell Physiol*. 131: 364-373.
- Sun Q, Wang XR, Ding SM, Yuan XF. 2005. Effects of interactions between cadmium and zinc on phytochelatin and glutathione production in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ Toxicol*. 20: 195-201.
- Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Slotwińska M, Kamińska T, Sniezko R, Paduch R, Abramczyk D, Filar J, Kandefer-Szerszeń M. 2000. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. *Toxicology*. 145: 159-171.
- Tallkvist J, Bowlus CL, Lönnerdal B. 2001. DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicol Lett*. 122: 171-177.
- Tandy S, Williams M, Leggett A, Lopez-Jimenez M, Dedes M, Ramesh B, Srai K, Sharp P. 2000. Nramp2 expression is associated with pH-dependant iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J Biol Chem*. 275: 1023-1029.
- Tang W, Sadovic S, Shaikh ZA. 1998. Nephrotoxicity of cadmium-metallothionein: protection by zinc and role of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol*. 151: 276-282.
- Ullrich V, Kissner R. 2006. Redox signaling: bioinorganic chemistry at its best. *J Inorg Biochem*. 100: 2079-2086.

- Urani C, Melchiorretto P, Canevali C, Crosta GF. 2005. Cytotoxicity and induction of protective mechanisms in HepG2 cells exposed to cadmium. *Toxicol In Vitro*. 19: 887-892.
- Vachon PH, Perreault N, Magny P, Beaulieu JF. 1996. Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes. *J Cell Physiol*. 166: 198-207.
- Valko M, Morris H, Cronin M. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*. 12: 1161-1208.
- Van Oostdam J, Gilman A, Dewailly E, Usher P, Wheatley B, Kuhnlein H, Neve S, Walker J, Tracy B, Feeley M, Jerome V, Kwavnick B. 1999. Human health implications of environmental contaminants in Arctic Canada: a review. *Sci Total Environ*. 230: 1-82.
- Voet D, Voet JG. 1995. *Biochemistry*. 2nd edition. John Wiley and Sons. New York.
- Wang Y, Fang J, Leonard SS, Rao KM. 2004. Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 36: 1434-1443.
- Watkin RD, Nawrot T, Potts RJ, Hart BA. 2003. Mechanisms regulating the cadmium-mediated suppression of Sp1 transcription factor activity in alveolar epithelial cells. *Toxicology*. 184: 157-178.
- WHO. 1989. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants (Thirty-third Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series No. 776. Geneva, Switzerland.
- WHO. 1992. WHO, Cadmium. World Health Organization, Environmental Health Criteria No. 134. Geneva, Switzerland.
- Wong HL, Sakamoto T, Kawasaki T, Umemura K, Shimamoto K. 2004. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiol*. 135: 1447-1456.
- Yang CF, Shen HM, Shen Y, Zhuang ZX, Ong CN. 1997. Cadmium-induced oxidative cellular damage in human fetal lung fibroblasts (MRC-5 cells). *Environ Health Perspect*. 105: 712-716.
- Yoshida M, Saegusa Y, Fukuda A, Akama Y, Owada S. 2005. Measurement of radical-scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using in vivo electron spin resonance spectroscopy. *Toxicology*. 213: 74-80.
- Zablocka A, Janusz M. 2008. The two faces of reactive oxygen species. *Postepy Hig Med Dosw*. 62: 118-124.

Zödl B, Zeiner M, Sargazi M, Roberts NB, Marktl W, Steffan I, Ekmekcioglu C. 2003. Toxic and biochemical effects of zinc in Caco-2 cells. *J Inorg Biochem.* 97: 324-330.

Zweibaum A, Triadou N, Keding M, Augeron C, Robine-Léon S, Pinto S, Rousset M, Haffen K. 1983. Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon. *Int J Cancer.* 32: 407-412.